Pr 3966

HALIOTIS

VOL. 31
2002

issn 0397.765 x

SOCIETE FRANÇAISE DE MALACOLOGIE

Haliotis, revue de la Société Française de Malacologie, est ouverte à des articles originaux couvrant tous les aspects de l'étude des Mollusques. Son rythme de parution est en principe annuel, avec un ou plusieurs fascicules.

La soumission d'un manuscrit à *Haliotis* sous-entend qu'il n'est pas publié ou sous presse ailleurs. Les auteurs qui désireront utiliser ultérieurement des matériaux publiés dans *Haliotis* devront préalablement obtenir la permission de la S.F.M.

Soumission des manuscrits

Les textes doivent être saisis sous un traitement de texte d'usage courant. Il sera soumis dans un premier temps deux exemplaires tirés sur format A4 avec double interligne, ainsi que deux copies des illustrations. Les manuscrits sont à adresser au secrétariat général de la S.F.M., 55 rue Buffon, 75005 Paris, ou à un des membres du comité de rédaction.

Le manuscrit sera lu par un ou plusieurs spécialistes choisi(s) par le comité de rédaction, dont les commentaires seront adressés à l'auteur (sous forme anonyme ou non au choix du rapporteur). L'auteur a l'obligation de prendre en considération les commentaires du rapporteur et adressera s'il y a lieu une version révisée. Le comité de rédaction prendra alors, au vu des commentaires du rapporteur, une décision d'acceptation ou de refus du manuscrit.

Organisation du texte

- titre concis et informatif: pensez qu'il doit servir à l'indexation. Si le titre contient un nom de genre ou d'espèce peu connu, ce nom sera accompagné du nom d'un taxon supraspécifique
- prénoms (en entier) et noms des auteurs
- adresses des auteurs.
- "abstract" en Anglais, précédé du titre en Anglais.
- résumé en Français (éventuellement, titre en Français si l'article est rédigé dans une autre langue) exposant les principaux résultats, mais pas de descriptions de taxa nouveaux éventuellement introduits dans l'article.; éventuellement, résumé dans une autre langue si approprié.
- texte proprement dit comprenant, dans cet ordre, Introduction, Matériel et méthodes, Résultats, Discussion, Conclusions, Remerciements, Bibliographie.

Les niveaux hiérarchiques de sous-titres seront limités le plus possible. Les sous-titres ne seront en aucun cas numérotés.

Illustrations

Seules les illustrations en noir et blanc seront prises en charge par la revue. Le surcoût des illustrations en couleur sera à la charge des auteurs. Les illustrations, à leur taille définitive, mesurent au maximum 16,5 x 23 cm.

Les illustrations soumises après acceptation des manuscrits doivent être de bonne qualité, prêtes à cliché, ou des fichers électroniques au format TIFF, 600 ppp (noir et blanc) ou 300 ppp (demi-teintes). Pour les graphiques, des tirages d'imprimante laser ou à jet d'encre sur papier sont acceptables comme originaux, mais il est préférable d'adresser une copie électronique, au format TIFF ou dans le format natif du logiciel qui a produit le graphique si celui-ci est d'usage courant (Excel, Corel Draw...) *En aucun cas, les illustrations préalablement insérées dans un traitement de texte (Word ou autre) ne pourront être reproduites par l'imprimeur (ces logiciels altèrent les fichiers d'images insérées).*

Toutes les figures doivent être numérotées en une série unique, qu'il s'agisse de dessins, de photographies montées en planche, de cartes ou de graphiques. Les cartes devront faire figurer des coordonnées géographiques et avoir un cadre. Les tableaux (comportant exclusivement du texte ou des chiffres, à l'exclusion de graphiques) seront numérotés en une autre série. Les légendes des figures et des tableaux seront regroupées sur une feuille à part, et copiées également dans la disquette. Les auteurs pourront indiquer dans le texte la position souhaitée des figures et tableaux.

(suite sur la 3e page de couverture)

Editorial

S nov

Ce numéro d'*Haliotis*, comme celui d'il y a huit ans, est essentiellement constitué par un ensemble de travaux présentés lors d'un congrès de la Société Française de Malacologie.

Il s'agit cette fois du XIe congrès, organisé par nos collègues Pierre Lubet et Michel Mathieu, tenu à l'Université de Caen du 2 au 5 juillet 2001 sous le titre "Malacologie 2000". La S.F.M. exprime sa très vive gratitude envers les organismes qui ont contribué matériellement à l'organisation du congrès:

Le Conseil Régional de Basse-Normandie
La Ville de Caen
L'Université de Caen-Basse-Normandie
L'Office du Tourisme de Caen

Comme le n° 23, ce volume n'est pas un simple "acte de congrès". Les textes publiés ici (et d'autres à paraître dans le prochain n° 32) représentent une sélection des travaux présentés au congrès. Ils sont en général plus complets que les communications elles-mêmes, et tiennent compte s'il y a lieu de l'avis des référendaires.

* * * * *

Ce volume, ainsi que les huit précédents, a été édité par Serge Gofas. Cet éditorial est aussi un appel. Il n'est pas sain qu'une revue reste beaucoup plus longtemps entre les mains de la même personne, et il est temps que la communauté malacologique francophone réfléchisse pour proposer un successeur.

Malgré quelques incursions dans le domaine de la faunistique (et même quelques taxa nouveaux décrits dans *Haliotis*), le demaine de prédilection de la revue reste la recherche concernant des espèces commerciales et comestibles. Parmi nos collaborateurs les plus fidèles, nous trouvons nos collègues de l'IFREMER, et aussi des collègues de pays francophones d'Afrique du Nord qui ne sont pas encore soumis à l'implacable exigeance de publier exclusivement dans les revues figurant au *Science Citation Index*.

Je pense que, s'il y a une place pour *Haliotis*, c'est en persistant dans le domaine que la revue a affectionné jusqu'ici. Aux États-Unis, *Journal of Shellfish Research* s'est hissé au rang des revues les plus respectables et les mieux diffusées. En Europe, nous avons certes plusieurs revues malacologiques de haut niveau, et plusieurs autres dans le domaine des pêches, mais aucune ne possède cette spécificité pour l'axe mollusques - crustacés d'interêt commercial. Pourquoi pas *Haliotis*? Mais pour qu'un tel projet aille de l'avant, il faut des moyens éditoriaux autres qu'artisanaux, et c'est à cela aussi que la communauté malacologique française doit réfléchir.

Serge Gofas

BIBL. DU MUSÉUM PARIS

Bibliothèque Centrale Muséum
3 3001 00176784 6

Les mollusques bivalves primitifs: l'enquête paléontologique

Claude BABIN[1]

ABSTRACT

The primitive bivalve molluscs: the palaeontological investigation

During the three last decades palaeontological discoveries have given much new information about the primitive bivalves from the Early Cambrian to the Early Ordovician. These data are reviewed. They show that after an insignificance of the bivalve faunas in the Early and Middle Cambrian benthos, followed by a long gap without data, a sudden diversification occurred in the Early Ordovician. The phylogenetic relationships of these primitive bivalves, especially established with the dentitions, remain debated. A hypothetical edentulous ancestor, named proterodont, could be considered.

RÉSUMÉ

Les découvertes paléontologiques des trois dernières décennies ont fourni un lot d'informations nouvelles sur les bivalves primitifs du Cambrien inférieur à l'Ordovicien inférieur. Ces données sont passées en revue. Elles montrent l'insignifiance des faunes de bivalves dans le benthos du Cambrien inférieur et moyen et une brutale diversification à l'Ordovicien inférieur après une longue lacune de documentation. Les relations phylogénétiques de ces bivalves primitifs, largement fondées sur les dentures, demeurent discutées. Un ancêtre hypothétique édentule, dit protérodonte, pourrait être envisagé.

INTRODUCTION

Comme l'écrivait encore récemment Haszprunar (1996), les questions concernant l'origine des mollusques et leurs relations avec d'autres groupes sont aussi anciennes que la malacologie elle-même; les récentes publications montrent que ces débats sont toujours ouverts. A ce constat, relatif au phylum lui-même, il convient d'ajouter que les affinités ancestrales de la classe des bivalves au sein des mollusques restent aussi conjecturales puisque les uns les jugent proches des rostroconches (Runnegar & Pojeta, 1974; Waller, 1998) tandis que les autres les relient aux monoplacophores sténothécides (Carter *et al.*, 2000). On peut enfin ajouter avec Carter *et al.*

[1] UFR Sciences de la Terre, Université Claude Bernard-Lyon I, 27-43, bd du 11 novembre, F-69622 Villeurbanne cedex, France

(2000, p. 47) que la différenciation initiale des sous-classes et ordres des bivalves reste aussi mal éclaircie et est toujours l'objet de controverses. Ces problèmes de relations phylogénétiques sont désormais abordables, d'une part par la morphologie des parties minéralisées avec les fossiles (seuls documents disponibles pour les ensembles sans représentants actuels) et des organes mous avec les formes vivantes, d'autre part par les récents acquis de la biologie moléculaire. Ces diverses données sont souvent traitées maintenant en analyse cladistique. Les résultats qui en émergent sont loin d'être tous concordants. Le lecteur intéressé par ces questions trouvera des mises au point récentes sur ces controverses dans diverses publications (Salvini-Plawen & Steiner, 1996; Waller, 1998; Carter *et al.*, 2000) qui fournissent simultanément les références d'une abondante littérature. Je n'aborderai donc pas ici ces questions des origines et affinités du phylum Mollusca ni de celles de la classe Bivalvia, mais limiterai mon propos à l'examen du problème des formes ancestrales de bivalves et des premières diversifications au sein de la classe.

En effet, durant les trois dernières décennies, diverses découvertes paléontologiques dans des formations datées du Cambrien inférieur à l'Ordovicien inférieur (de 540 à 470 Ma environ) ont fourni un lot d'informations nouvelles sur les bivalves primitifs. Je donnais dans *Haliotis* en 1981 un état des connaissances disponibles sur le sujet à ce moment. Celles-ci venaient alors de s'enrichir, pour le Cambrien inférieur, de l'interprétation de *Fordilla* comme un indéniable pélécypode (Pojeta *et al.*, 1973) puis de la description d'une autre forme, *Pojetaia* (Jell, 1980). Dans les mêmes années, nous venions d'augmenter de façon significative le registre pour l'Ordovicien inférieur avec les découvertes effectuées en Australie (Pojeta & Gilbert-Tomlinson, 1977) et celles réalisées en Montagne Noire (Babin, 1982a). Vingt ans après, un bilan actualisé des nouveaux apports paraît démontrer une certaine diversité des bivalves dès le Cambrien inférieur et témoigne d'une réelle grande variété des faunes de l'Ordovicien inférieur. Ces jalons complémentaires pour les débuts de l'histoire des bivalves ont induit des réflexions variées sur le contexte des diversifications initiales et ont renouvelé les discussions sur les relations phylogénétiques des grands ensembles, ces dernières se trouvant abordées souvent désormais par des approches cladistiques.

LES DONNÉES PALÉONTOLOGIQUES

Les bivalves du Cambrien inférieur et moyen

Que les relations phylétiques des divers super-ordres au sein des bivalves demeurent l'objet de conjectures diverses, cela résulte de la pauvreté et des difficultés d'interprétation du matériel cambrien. On ne peut que reconnaître avec Geyer & Streng (1998, p. 94) que l'état présent des connaissances relatives aux pélécypodes cambriens reste peu propice à l'établissement d'hypothèses fiables sur les affinités systématiques et sur la phylogénie initiale des premiers bivalves. Il convient pourtant de souligner que des progrès non négligeables ont été effectués dans cette enquête. Un bref bilan des récents acquis peut en témoigner.

Après l'abandon du statut de pélécypode pour *Lamellodonta* décrit dans le Cambrien d'Espagne (Vogel, 1962) et interprété désormais comme un brachiopode inarticulé (Havlicek & Kríz, 1978), l'attention s'est reportée sur *Fordilla*. Ce petit fossile avait été initialement décrit dans le Cambrien inférieur d'Amérique du Nord dès 1881 par Barrande qui le figura dans son volume consacré aux "Acéphalés" tout en doutant de son statut de mollusque. Après sa révision (Pojeta *et*

al., 1973; Pojeta, 1975) et les diverses discussions qui s'ensuivirent (voir par exemple, Yochelson, 1981), *Fordilla* a été généralement considéré comme un bivalve primitif et sa distribution géographique se révéla être plus étendue (Groënland, Sibérie).

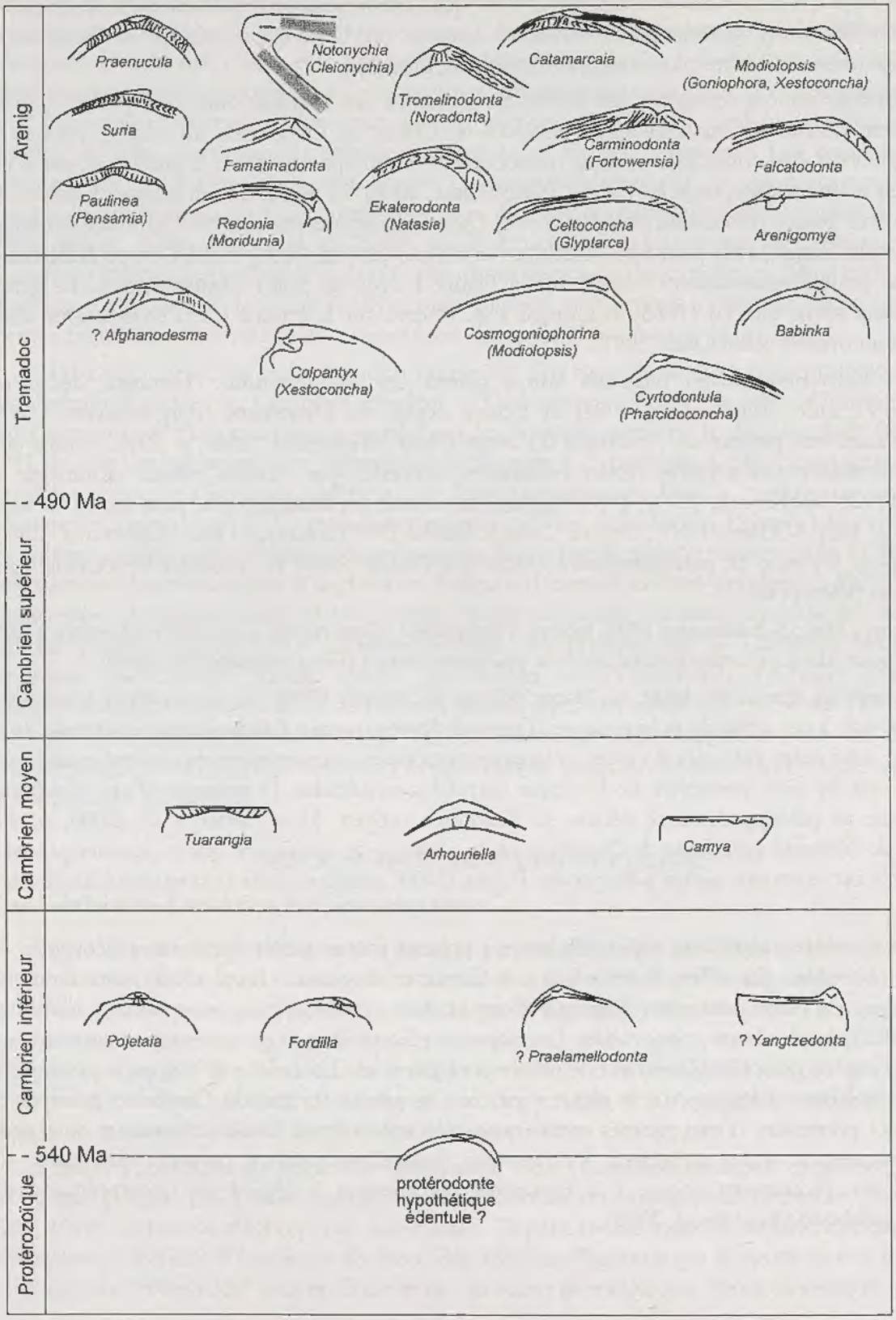
Dans les années suivantes, Jell (1980) fit connaître avec *Pojetaia* une autre petite coquille initialement décrite en Australie puis retrouvée en Chine, au Danemark, au Maroc. *Fordilla* et *Pojetaia* peuvent être considérés comme pratiquement contemporains dans la partie moyenne du Cambrien inférieur (Runnegar & Pojeta, 1992; Pojeta, 2000). Le statut de mollusques bivalves de divers autres genres (*Hubeinella*, *Xianfengoconcha*, *Cycloconchoides*) décrits dans le Cambrien inférieur de Chine par Zang (1980) peut être définitivement rejeté (Pojeta, 2000) et il en est probablement de même pour *Praelamellodonta* indiqué sur la Figure 1 avec un point d'interrogation. Le genre *Yangtzedonta* décrit par Yu (1985) et indiqué avec réserve sur la Figure 1, est énigmatique mais n'est pas un bivalve selon Qian (2001).

Au Cambrien moyen plusieurs autres genres ont été reconnus. *Tuarangia*, décrit en Nouvelle-Zélande (MacKinnon, 1982) et trouvé depuis au Danemark (Berg-Madsen, 1987), pourrait aussi être présent en Amérique du Nord (Hinz-Schallreuter, 2000, p. 236). Tandis que son appartenance aux bivalves restait initialement contestée par certains auteurs (Runnegar & Pojeta, 1992), MacKinnon (1982, 1985) l'interpréta comme un ptériomorphe primitif, et fut suivi en cela par Berg-Madsen (1987). Depuis Cope & Babin (1999) ainsi que Hinz-Schallreuter (2000) ont proposé d'y voir un paléotaxodonte tandis que Pojeta (2000) le considère désormais aussi comme un pélécypode.

Camya Hinz-Schallreuter, 1995, trouvé à Bornholm (Danemark), est placé également, à titre hypothétique, dans un ordre indéterminé de paléotaxodontes (Hinz-Schallreuter, 2000).

Arhouriella, qui a été décrit au Maroc (Geyer & Streng, 1998) sur un matériel très réduit (deux valves), a des affinités énigmatiques. Geyer & Streng, notant l'arrangement inattendu de la charnière avec dents bien développées et ligament amphidète et partiellement interne, suggèrent, puisque cela ne peut permettre de le placer parmi les nuculoïdes, la présence d'une deuxième sous-classe de pélécypodes aux débuts du Cambrien moyen. Mais Carter *et al.* (2000, p. 49) doutent de l'identité spécifique de l'holotype et du paratype et envisagent que le premier pourrait être plutôt un ostracode qu'un pélécypode. Pojeta (2000) souligne aussi la singularité de ce petit bivalve.

Le Cambrien supérieur, enfin, n'a jusqu'à présent fourni aucun fossile de pélécypode de façon indubitable. En effet, l'attribution au Cambrien supérieur basal d'un galet erratique d'Allemagne du Nord contenant *Tuarangia* (Berg-Madsen, 1987) repose, selon Hinz-Schallreuter (1995, 2000), sur des bases contestables. Cet important hiatus dans la documentation constitue un handicap majeur pour l'établissement de relations phylétiques. Yochelson (1978) juge qu'une telle lacune doit laisser sceptique sur le statut véritable des petites formes du Cambrien inférieur et moyen qui pourraient n'être pas des mollusques pélécypodes mais des représentants de classes sans descendance. Pour cet auteur, les premiers bivalves ne seraient présents qu'à partir de l'Ordovicien; récemment encore il a renouvelé ses réserves à l'égard de l'interprétation du matériel cambrien (Yochelson, 2000).


Arenig
Praenucula
Notonychia (Cleionychia)
Tromelinodonta (Noradonta)
Catamarcaia
Modiolopsis (Goniophora, Xestoconcha)
Suria
Famatinadonta
Carminodonta (Fortowensia)
Falcatodonta
Paulinea (Pensamia)
Redonia (Moridunia)
Ekaterodonta (Natasia)
Celtoconcha (Glyptarca)
Arenigomya
Tremadoc
? Afghanodesma
Colpantyx (Xestoconcha)
Cosmogoniophorina (Modiolopsis)
Babinka
Cyrtodontula (Pharcidoconcha)
- 490 Ma
Cambrien supérieur
Cambrien moyen
Tuarangia
Arhouriella
Camya
Cambrien inférieur
Pojetaia
Fordilla
? Praelamellodonta
? Yangtzedonta
- 540 Ma
Protérozoïque
protérodonte hypothétique édentule ?

La diversification explosive des bivalves à l'Ordovicien inférieur

Les découvertes réalisées lors des deux dernières décennies ont considérablement enrichi nos connaissances relatives à la diversité des bivalves à l'Ordovicien inférieur (Pojeta & Gilbert-Tomlinson, 1977; Babin, 1982a, b; Sánchez & Babin, 1992; Cope, 1996b; Sánchez 1997a, b, 2001). La Figure 1 montre qu'après une longue lacune de documentation au Tremadoc inférieur, qui poursuit celle du Cambrien supérieur, une diversification s'ébauche au Tremadoc supérieur puis explose à l'Arenig inférieur. La variété des morphologies et des dentures témoigne alors de la présence de représentants pour tous les super-ordres, à l'exception de celui des Cryptodonta. Il est intéressant, par ailleurs, de noter (Babin, 1993) que cette importante diversification se réalise sur les fonds clastiques des plates-formes qui entourent à ce moment le vaste supercontinent du Gondwana (Australie, Afrique du Nord, domaine ibéro-armoricain, Amérique du Sud) ou une aire voisine dite Avalonia (Pays de Galles). Commençant de façon limitée à l'Ordovicien moyen, la dispersion des bivalves vers d'autres domaines paléogéographiques ne se réalisera avec ampleur qu'à l'Ordovicien supérieur c'est-à-dire quelque vingt millions d'années après la diversification initiale; les formes épibenthiques et semi-endobenthiques deviendront alors prédominantes dans des environnements de fonds plus carbonatés.

INTERPRÉTATION ET HYPOTHÈSES

Mode de vie des bivalves primitifs

Les premières petites formes cambriennes ont été considérées tantôt comme endobenthiques (Stanley, 1975, p. 369), tantôt comme des épibenthiques suspensivores (Tevesz & McCall, 1976; Vogel & Gutmann, 1980); pour les derniers de ces auteurs, les bivalves fouisseurs ne seraient apparus qu'à l'Ordovicien (p. 188). Geyer & Streng (1998) jugent que leurs petites faunes du Cambrien de l'Anti-Atlas marocain étaient endobenthiques et constatent, par ailleurs, que les caractéristiques musculaires de *Fordilla* et de *Pojetaia* laissaient peu de place pour un appareil branchial de taille appropriée à un mode suspensivore; ils rappellent néanmoins que Runnegar & Bentley (1983) ont argué que *Pojetaia* et *Fordilla* étaient assez petits pour être suspensivores sans organes spécialisés à l'instar des spécimens juvéniles de l'actuelle *Nucula*. On peut aussi suggérer que de telles minuscules coquilles aient été celles d'éléments suspensivores de la méiofaune.

Quoi qu'il en soit du mode de vie de ces formes ancestrales, il appert que les bivalves de l'Ordovicien inférieur, aux dimensions plus grandes, ont été majoritairement endobenthiques dans des environnements sablo-vaseux.

Figure 1. Bilan provisoire des genres de bivalves du Paléozoïque inférieur (l'échelle verticale est proportionnelle aux durées estimées [en millions d'années, Ma]). Les genres cités entre parenthèses sont proches de ceux qui sont représentés. Dans le Cambrien inférieur, le statut de mollusque bivalve de *Praelamellodonta* et de *Yangtzedonta* demeure contesté. Dans le Tremadoc, l'âge d'*Afghanodesma* reste douteux. Les genres trernadociens représentés sont tous du Tremadoc supérieur, le schéma montre donc l'importante lacune de la documentation (environ 20 Ma). Les genres arenigiens sont de l'Arenig inférieur ou moyen, cela souligne le caractère explosif de cette diversification ordovicienne (d'après Babin *in* Babin & Hammann, 2001, modifié).

Signification phylogénétique des bivalves primitifs

Les relations phylétiques de ces bivalves, avec le caractère explosif de la diversification ordovicienne, restent difficiles à établir et font l'objet d'hypothèses diverses.

La division en deux sous-classes, Protobranchia et Autolamellibranchia, des bivalves actuels repose sur la structure branchiale, un caractère non fossilisable. C'est donc par induction à partir d'autres caractères des coquilles que l'on peut, éventuellement, tenter de localiser le passage de la cténidie protobranche à la branchie filibranche si l'on admet cette succession des structures branchiales. Waller (1988) suggéra que les tironuculidés à denture paléotaxodonte, auraient pu avoir réalisé la branchie filibranche. Dans un raisonnement argumenté, Cope (1996 a) attribue cette acquisition à une autre famille de paléotaxodontes, celle des cardiolariidés.

Parmi le faible nombre d'éléments morphologiques disponibles ceux de la charnière sont les plus sollicités pour les essais de reconstitutions phylogénétiques. De longues controverses ont, en particulier, débattu des relations d'antériorité relative des dentures taxodonte et actinodonte (voir Sánchez & Babin, 1998). Dans une récente tentative d'analyse cladistique, Carter *et al.* (2000) retiennent 28 caractères concernant la seule denture sur les 117 caractères listés. Ces auteurs proposent des affinements dans la description des charnières taxodontes avec la distinction des types prétaxodonte, pseudotaxodonte, hétérotaxodonte. Parmi les résultats suggérés par cette étude cladistique, retenons notamment deux assertions: "l'ancêtre commun de *Tuarangia* et *Pojetaia* avait... une charnière droite, édentule, ..." (p. 60) et "la présente analyse supporte l'hypothèse de Sánchez & Babin (1998) que nuculoïdes et paléohétérodontes partagent simplement un ancêtre commun". A ce propos, il est important de noter que *Fordilla* était considéré comme non-prétaxodonte. On pourrait arguer que *Fordilla* a, en fait, une dentition prétaxodonte réduite en considérant ses proches affinités avec *Pojetaia*. Dans un ou l'autre cas, cependant, la denture fordilloïde, et en conséquence la denture précédant immédiatement la différenciation des sous-classes Palaeotaxodonta et Autolamellibranchiata, était très peu dentée et n'était ni paléotaxodonte ni actinodonte" (p. 61).

C'est pourquoi j'ai récemment (*in* Babin & Hammann, 2001) proposé d'envisager un habitus édentule, désigné protérodonte, totalement hypothétique il est vrai, comme originel pour les mollusques bivalves (Figure 1). Le caractère édentule de la charnière pose certes problème pour les études phylogénétiques car il s'est probablement réalisé indépendamment à plusieurs reprises chez les bivalves (Carter *et al.*, 2000, p. 51) et cela dès l'Ordovicien inférieur avec *Modiolopsis* par exemple (Babin & Hammann, 2001). Cependant cette hypothèse est la plus parcimonieuse pour permettre une émergence indépendante des premières dentures d'archétypes taxodonte et paléohétérodonte. Je ne crois pas, il est vrai, contrairement à un cladisme pur, que l'évolution emprunte nécessairement les voies les plus économes, ce que laisse supposer l'application rigide du principe de parcimonie, mais, en l'occurrence, une telle hypothèse de simplicité originelle ne me paraît pas absurde. On peut constater d'ailleurs que certaines charnières figurées de bivalves cambriens pourraient bien offrir un tel caractère édentule, le cas du paratype d'*Ahorniella* (Geyer & Streng, 1998, fig. 7 F-I) n'est pas sans intérêt à cet égard comme l'ont remarqué Carter *et al.* (2000, p. 49).

Dans cette hypothèse encore, il est loisible d'envisager que le statut de la cténidie ne relève pas davantage de la succession protobranche-filibranche que la denture ne relève de la succession

paléotaxodonte-actinodonte. La réalisation de ces types branchiaux pourrait avoir émergé indépendamment d'un type plus simple, inconnu car sans représentants dans l'Actuel.

CONCLUSIONS

La reconstitution de l'histoire des premiers bivalves demeure très incomplète et fragile. On peut espérer que la multiplication des investigations de terrain aboutira à la découverte de nouveaux documents cambriens (minifossiles phosphatés par exemple) mais il nous manque jusqu'alors pour les bivalves un tel "micromollusean Lagerstatte" (gisement à fossilisation exceptionnelle de micromollusques) comme le souligne justement Runnegar (1996, p. 85).

Si les bivalves sont apparus, comme tant d'autres classes, lors de ce qu'il est convenu d'appeler "l'explosion cambrienne", ils l'ont fait de façon extrêmement discrète en restant peu diversifiés (quatre genres seulement au plus sont connus du Cambrien inférieur) avec peu d'espèces et d'individus. Il faut attendre, après une surprenante lacune de documentation de quelque vingt millions d'années, le cours de l'Ordovicien inférieur pour assister à une brutale diversification. Localisée sur les plates-formes périgondwaniennes à fonds clastiques, celle-ci montre l'apparition de tous les super ordres importants connus. L'état actuel des connaissances reste peu favorable à la reconstitution de la phylogénie initiale des pélécypodes. Cela justifie que la Figure 1 ne présente pas d'essai de relations phylogénétiques.

REMERCIEMENTS

Je suis redevable à un rapporteur anonyme de ses judicieuses remarques qui m'ont permis de compléter le texte et les références

BIBLIOGRAPHIE

Babin C, 1981 Les faunes arenigiennes (Ordovicien inférieur) de la Montagne Noire (France) et la phylogénie des mollusques bivalves primitifs. *Haliotis* **11**. 37-45.

Babin C, 1982a *Tromelonodonta* nov. gen., Bivalve Lyrodesmatide (Mollusca) de l'Arenigien (Ordovicien inférieur). *Geobios* **15**(3): 423-427.

Babin C, 1982b Mollusques bivalves et rostroconches *In* Brachiopodes (articulés) et Mollusques (bivalves, rostroconches, monoplacophores, gastropodes) de l'Ordovicien (Trémadocien-Arenigien) de la Montagne Noire (France méridionale) (C Babin, R Courtessole, M Mélou, J Pillet, D Vizcaino & E L Yochelson, éds). *Mémoire de la Société des Etudes Scientifiques de l'Aude*: 37-49.

Babin C., 1993 Rôle des plates-formes gondwaniennes dans les diversifications des mollusques bivalves durant l'Ordovicien. *Bulletin de la Société Géologique de France* **164** 141-153.

Babin C & Hammann W, 2001. Une nouvelle espèce de *Modiolopsis* (Bivalvia) dans l'Arenig (Ordovicien inférieur) de Daroca (Aragon, Espagne); réflexions sur la denture des bivalves primitifs *Revista Española de Paleontología* **16**(2): 269-282.

Barrande J, 1881. *Système silurien du centre de la Bohême. Vol. VI. Acéphalés* 342 p., 361 pl. Paris, Prague

Berg-Madsen V, 1987 *Tuarangia* from Bornholm (Denmark) and similarities in Baltoscandian and Australasian late Middle Cambrian faunas *Alcheringa* **11**: 245-259.

Carter J G , Campbell D C & Campbell M.R., 2000. Cladistic perspectives on early bivalve evolution. *In* Evolutionary Biology of the Bivalvia (E.M Harper, J.D Taylor & J A Crame, eds) *Geological Society, London, Special Publications* **177**: 47-79.

Cope J C W 1996a The early evolution of the Bivalvia *In* Origin and evolutionary radiation of the Mollusca (J. Taylor, ed.): 361-370. Oxford Science Publications.

Cope J C W , 1996b Early Ordovician (Arenig) bivalves from the Llangynor Inlier, South Wales *Palaeontology* **39**(4): 979-1025

Cope J C.W & Babin C , 1999. Diversification of bivalves in the Ordovician *Geobios* **32** (2). 175-185.

Geyer G & Streng M., 1998. Middle Cambrian pelecypods from the Anti-Atlas, Morocco. *Revista Española de Paleontología*, n° extraordinario en homenaje al Prof. Gonzalo Vidal: 83-96

Haszprunar G , 1996 The Mollusca: coelomate turbellarians or mesenchymate annelids? *In* Origin and evolutionary radiation of the Mollusca (J.D. Taylor, ed.): 3-28. Oxford Science Publications

Havlicek V & Kriz J , 1978 Middle Cambrian *Lamellodonta simplex* Vogel 'bivalve' turned brachiopod *Trematolobus simplex* (Vogel) *Journal of Paleontology* **52**(5): 972-975.

Hinz-Schallreuter I , 1995 Muscheln (Pelecypoda) aus dem Mittelkambrium von Bornholm *Geschiebekunde aktuell* **11**(3). 71-84

Hinz-Schallreuter I , 2000 Middle Cambrian Bivalvia from Bornholm and a review of Cambrian bivalved Mollusca. *Revista Española de Micropaleontología* **32**. 225-242.

Jell P.A., 1980. Earliest known pelecypod on Earth A new Early Cambrian genus from South Australia *Alcheringa* **4**. 233-239.

MacKinnon D I , 1982 *Tuarangia paparua* n. gen and n sp , a late Middle Cambrian pelecypod from New Zealand. *Journal of Paleontology* **56**(3): 589-598.

McKinnon D.I., 1985. New Zealand late Middle Cambrian molluscs and the origin of Rostroconcha and Bivalvia *Alcheringa* **9**(1-2): 65-81.

Morris N J & Fortey R.A , 1976. The significance of *Tironuncula* gen nov to the study of bivalve evolution *Journal of Paleontology* **50**: 701-709.

Pojeta J , Jr , 1975 *Fordilla troyensis* Barrande and early pelecypod phylogeny *Bulletin of American Paleontology* **67**(287). 363-384

Pojeta J., Jr. & Gilbert Tomlinson J , 1977. Australian Ordovician Pelecypod Molluscs. *Bureau of Mineral Resources, Geology and Geophysics Bulletin* **174**, 64 p.

Pojeta J , Jr , 2000 Cambrian Pelecypoda (Mollusca) *American Malacological Bulletin*, **15**(2) 157-166.

Pojeta J , Jr , Runnegar B & Kriz J., 1973. *Fordilla troyensis* Barrande the oldest known pelecypod. *Science* **180**: 866-868

Qian Y , 2001 *Yangtzedonta* and the early evolution of shelled molluscs *Chinese Science Bulletin* **46** (24) 2103-2106.

Runnegar B , 1996 Early evolution of the Mollusca: the fossil record *In* Origin and evolutionary radiation of the Mollusca (J. Taylor, ed.): 77-87. Oxford Science Publications

Runnegar B. & Bentley C., 1983 Anatomy, ecology, and affinities of the Australian Early Cambrian bivalve *Pojetaia runnegari* Jell. *Journal of Paleontology* **57**(1): 73-92

Runnegar B & Pojeta J., Jr., 1974. Molluscan phylogeny: the paleontological viewpoint. *Science* **186**: 311-317.

Runnegar B. & Pojeta J., Jr., 1992. The earliest bivalves and their Ordovician descendants. *American Malacological Bulletin* **9**: 117-122.

Salvini-Plawen L. v. & Steiner G., 1996. Synapomorphies and plesiomorphies in higher classification of Mollusca. *In* Origin and evolutionary radiation of the Mollusca (J. Taylor, ed.): 29-51. Oxford Science Publications.

Sánchez T.M., 1997a. Natasinae, a new subfamily of Tironuculidae (Bivalvia, Palaeotaxodonta) from the Acoite Formation (Early-Middle Arenig), Northwestern Argentine. *Geobios* **20**: 471-475.

Sánchez T.M. 1997b. Additional Mollusca (Bivalvia and Rostroconchia) from the Suri Formation, Early Ordovician (Arenig), Western Argentina. *Journal of Paleontology* **71**(6): 1046-1054.

Sánchez T.M. 2001. Moluscos bivalvos de la Formación Molles (Arenigiano medio), sierra de Famatina, Argentina. *Ameghiniana* **38**(2): 185-193.

Sánchez T.M. & Babin C., 1992. Un insolite mollusque bivalve, *Catamarcata* n.g., de l'Arenig (Ordovicien inférieur) d'Argentine. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, Paris*, série II, **316**: 265-271.

Sánchez T.M. & Babin C., 1998. The origin of actinodont from taxodont dentition or vice versa, an unnecessary controversy? *In* Bivalves : An Eon of Evolution – Paleobiological Studies Honoring Norman D. Newell (P.A. Johnston & J.W. Haggart, eds): 409-412. University of Calgary Press.

Stanley S.M., 1975. Adaptive themes in the evolution of the Bivalvia (Mollusca). *Earth and Planetary Sciences* **3**: 361-385.

Tevesz M.J.S. & McCall P.L., 1976. Primitive life habits and adaptive significance of the pelecypod form. *Paleobiology* **2**(3): 183-190.

Vogel K., 1962. Muscheln mit Schlosszahneen aus dem spanischen Kambrium und ihre Bedeutung fur die Evolution der Lamellibranchiaten. *Akademie der Wissenschaften und Literatur, Mainz, Abhandlungen der Mathematisch-naturwissenschaftlichen Klasse* **4**: 197-244.

Vogel K. & Gutmann W.F., 1980. The derivation of pelecypods, rôle of biomechanics, physiology and environment. *Lethaia* **13**(3): 269-275.

Waller T.R., 1988. A phylogeny of the Bivalvia: Progress and problems. 54th Annual Meeting, American Malacological Union, Charleston, Abstracts: 19.

Waller T.R., 1998. Origin of the molluscan class Bivalvia and a phylogeny of major groups. *In* Bivalves : An Eon of Evolution – Paleobiological Studies Honoring Norman D. Newell (P.A. Johnston & J.W. Haggart, eds): 1-45. University of Calgary Press.

Yochelson E.L., 1978. An alternative approach to the interpretation of the phylogeny of ancient mollusks. *Malacologia* **17**(2): 185-191.

Yochelson E.L. 1981. *Fordilla troyensis* Barrande: "the oldest known pelecypod" may not be a pelecypod. *Journal of Paleontology* **55**(1): 113-125.

Yochelson E.L., 2000. Concerning the concept of extinct classes of Mollusca: or what may/may not be a class of mollusks. *American Malacological Bulletin* **15**(2): 195-202.

Yu W., 1985. *Yangtzedonta* – a problematic Bivalvia from the Meishucunian Stage, China. *Acta Micropalaeontologica Sinica* **2**: 401-408.

Zhang R , 1980 On the earliest bivalve fauna bivalves from the Lower Cambrian Tianheban Formation, Xianfeng, Hubei *Bulletin of the Chinese Academy of Geological Sciences*, **7**, résumé en anglais 17-18

Nouvelle fonction de transfert basée sur les mollusques terrestres et utilisant la méthode du Rang Climatique Mutuel

Olivier MOINE [1], Denis-Didier ROUSSEAU [1,2], Dominique JOLLY [1] et Marc VIANEY-LIAUD [3]

ABSTRACT

New transfer function from terrestrial molluscs and based on the Mutual Climatic Range method

The Mutual Climatic Range Method initially developed to quantify temperatures from modern and fossil insect assemblages has been successfully applied to terrestrial malacofaunas. The successful attempt realized on modern assemblages has allowed the reconstruction of the latitudinal european thermal gradient. The use of the defined transfer functions on fossil assemblages of Achenheim (Alsace, France) allowed the reconstruction of the main temperature variations of the last 120,000 years.

RÉSUMÉ

La méthode du Rang Climatique Mutuel initialement créée pour quantifier des températures à partir d'assemblages actuels et fossiles d'insectes a été appliquée avec succès aux malacofaunes terrestres. L'essai réalisé sur des assemblages actuels a permis de restituer le gradient thermique latitudinal européen. L'application de ces nouvelles fonctions de transfert sur des assemblages fossiles d'Achenheim (Alsace, France) a permis de reconstruire les variations de température majeures des derniers 120000 ans.

[1] Paléoenvironnements, Institut des Sciences de l'Evolution (UMR CNRS 5554), Université Montpellier II, case 61, place E. Bataillon, F-34095 Montpellier cedex 5, France
[2] Lamont-Doherty Earth Observatory of Columbia University, Palisades, New York 10964, U.S.A.
[3] Génétique et Environnement, Institut des Sciences de l'Evolution (UMR CNRS 5554), Université Montpellier II, case 64, place E. Bataillon, F-34095 Montpellier cedex 5, France

INTRODUCTION

Depuis les travaux de Imbrie et Kipp relatifs aux microfaunes marines (Imbrie & Kipp, 1971), différents types de fonctions de transfert ont été appliqués avec succès durant les trente dernières années sur des indicateurs paléobioclimatiques (en Anglais, "proxies") continentaux variés tels que le pollen, les insectes, les diatomées, les ostracodes, les rongeurs et les mollusques. Leurs modes de calcul diffèrent suivant la sensibilité des organismes à leur environnement, et le choix d'une méthode appropriée dépend de la façon dont se présentent les données avec le proxy utilisé (Guiot, 1991). Les mollusques sont très sensibles à leur environnement, et en enregistrent les variations (Rousseau, 1989). La température compte parmi les paramètres les plus influents sur leur physiologie (Barnhart & Armitage, 1979; Langley, 1979; Armitage & Stinson, 1980; Chevalier, 1982; Lambert & Daguzan, 1987; Le Calve & Daguzan, 1989), déterminant pour chaque espèce un intervalle de vie optimal (Sacchi & Testard, 1971), ce qui en fait un paramètre approprié aux reconstructions quantifiées.

Toutefois, les reconstructions basées sur les mollusques terrestres reposent sur une hypothèse fondamentale qui est, pour chaque espèce, la conservation des mêmes tolérances écologiques tout au long du Quaternaire. Depuis les travaux importants réalisés par Lozek sur les malacofaunes actuelles et fossiles d'Europe de l'Est (Lozek, 1964), cette hypothèse semble vérifiée pour la majorité des espèces, et est donc généralement admise. La deuxième qualité de ce proxy est l'abondance des individus fossiles dans les séries sédimentaires loessiques (dépôts éoliens), où ils sont souvent les seuls macrorestes biologiques disponibles.

Jusqu'à présent, les seules estimations de températures basées sur les mollusques terrestres ont été réalisées avec la méthode des analogues (Rousseau, 1991), qui attribue à un assemblage fossile les caractéristiques moyennées des dix assemblages les plus similaires parmi un vaste ensemble d'assemblages variés actuels. Néanmoins, l'application de cette méthode est limitée par le manque de diversité des assemblages analogues actuels et une aire d'application restreinte à l'Europe de l'Ouest. Ce dernier point a motivé l'adaptation de la méthode du Rang Climatique Mutuel (Atkinson *et al.*, 1987) aux données malacologiques et son application aux mêmes assemblages fossiles que Rousseau (1991) dans un but comparatif.

MATÉRIEL ET MÉTHODE

La méthode du Rang Climatique Mutuel repose sur les aires de distribution géographiques des différentes espèces et des paramètres climatiques qui leur sont associés. Une grille dont les nœuds sont espacés de 0.5° en longitude et latitude, a été définie pour l'Europe afin d'homogénéiser la numérisation des paramètres climatiques (températures dans le cadre de cette étude) extraits d'une banque de données globales (Leemans & Cramer, 1991), et des distributions spécifiques en Europe centrale et de l'Ouest tirées d'un atlas (Kerney *et al.*, 1983) (Figure 1). Les espèces de mollusques terrestres concernées appartiennent aux sous-classes des prosobranches et des pulmonés.

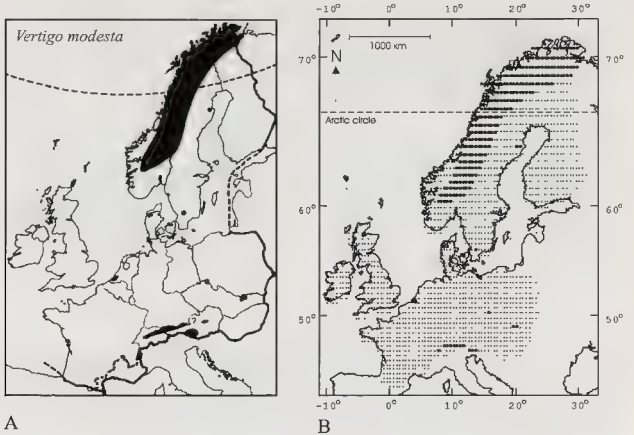


Figure 1 Exemple d'une distribution géographique spécifique de l'atlas de Kerney *et al.* (1983) (A) et de son équivalent numérisé (B). Aux couples de coordonnées de chaque nœud de la grille définie sur l'Europe est associé la valeur 0, schématisée par un point ou 1, schématisée par un cercle plein, en fonction de l'absence ou de la présence de l'espèce

Pour l'ensemble des nœuds de la grille de la zone étudiée, des modèles linéaires généraux ont été calculés, reliant par un polynôme du second degré la probabilité de présence/absence d'une espèce avec les valeurs des douze moyennes mensuelles, des moyennes mensuelles minimales (Tmin) et maximales (Tmax), et de l'amplitude annuelle (Tamp). Le choix du polynôme de degré deux découle directement de la notion d'intervalle thermique de vie limité par des seuils physiologiques. Le calcul du critère d'Akaike (Akaike, 1973), renseignant sur la vraisemblance du modèle corrélant une distribution géographique spécifique à un paramètre, indique que ces distributions sont principalement contraintes par les isothermes de Tmin et Tamp. Tmax devra donc être reconstruite par addition des deux précédents paramètres.

L'étape suivante consiste à réaliser pour chaque espèce une Enveloppe Climatique Spécifique qui est constituée par l'ensemble des nœuds de la grille, présents dans l'aire de distribution de l'espèce, et placés dans un diagramme ayant en abscisse les valeurs de Tmin et en ordonnée celles de Tamp (Figure 2). La superposition de plusieurs Enveloppes Climatiques Spécifiques pour un assemblage malacologique donné détermine une enveloppe restreinte commune à toutes, dénommée Rang Climatique Mutuel. La médiane calculée sur la distribution

du Rang Climatique Mutuel le long de chaque axe fournit la valeur la plus probable de chaque paramètre Tmin et Tamp. Les valeurs extrêmes du Rang Climatique Mutuel le long de chaque axe ont été choisies pour représenter l'incertitude sur la valeur la plus probable calculée.

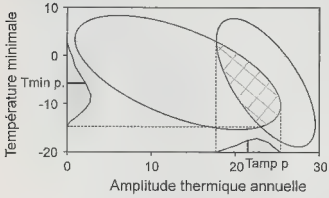


Figure 2. Principe de la méthode du Rang Climatique Mutuel. La zone de recouvrement (hachurée) de plusieurs Enveloppes Climatiques Spécifiques (schématisées par des ellipses) est le Rang Climatique Mutuel. Les valeurs prédites des deux paramètres, Tmin p. et Tamp p., sont issues du calcul de la médiane calculée sur la distribution du Rang Climatique Mutuel le long de chaque axe. Sur chaque axe, les bornes du Rang Climatique Mutuel définissent contraignent l'intervalle d'erreur de la valeur prédite.

RÉSULTATS

La méthode du Rang Climatique Mutuel a d'abord été appliquée à des assemblages actuels localisés du Nord de la Norvège au Sud de la France. Les échantillons proviennent de 7 régions climatiquement distinctes. Les valeurs estimées de Tmin et Tmax décrivent le gradient thermique latitudinal européen. Néanmoins, les valeurs thermiques reconstruites divergeant de celles observées (Figure 3), une régression linéaire a donc été calculée pour Tmin et pour Tmax afin de corriger ces dérives et définir ainsi de nouvelles fonctions de transfert. Celles-ci ont pour équation:

$$\text{Tmin calibrée} = 0.63\ \text{Tmin prédite} - 0.91$$

$$\text{Tmax calibrée} = 0.44\ \text{Tmax prédite} + 9.00$$

Ces équations sont appliquées par la suite aux valeurs prédites à partir d'assemblages fossiles. Ces équations ne sont pas appliquées aux valeurs des bornes du Rang Climatique Mutuel qui reflètent directement la relation entre la distribution géographique spécifique et la présence/absence des espèces.

Les assemblages du Pleistocène supérieur de la séquence loessique d'Achenheim (Alsace, France) ont été analysés à l'aide de ces nouvelles fonctions de transfert Quelques assemblages de la base de la séquence n'ont livré aucune coquille ce qui explique la discontinuité des courbes (Figure 4). Les résultats obtenus sont satisfaisants puisque du dernier interglaciaire (environ -130000 ans) à la base de la séquence, les deux courbes de températures, minimales et maximales, baissent d'abord progressivement jusqu'à -7 m. Puis vers -7 m intervient un refroidissement brusque et plus intense suivi d'une phase globalement plus froide aux alentours du Dernier Maximum Glaciaire situé vers -2.5 m (environ -24000 ans). Une tendance au réchauffement peu marquée dans les deux derniers mètres de la séquence marquerait le point de départ de la dernière déglaciation.

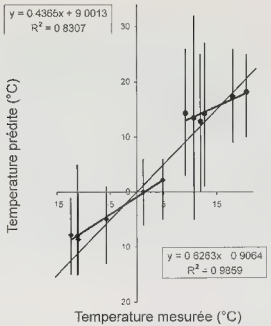


Figure 3. Calibration des températures prédites à l'aide des températures mesurées ou interpolées aux coordonnées des sites actuels utilisés Pour chacun des deux paramètres, Tmin et Tamp, les résultats obtenus sont distinctement groupés Les résultats moyens obtenus pour les échantillons des six régions ont été figurés par des cercles noirs. Chacun de ces points représente la moyenne d'un ensemble de valeurs (1, 4, 7, 8, 10, et 37 pour les différentes régions) localisées dans un périmètre d'une dizaine de kilomètres. Pour chaque région, les barres d'erreur sont basées sur les deux valeurs locales les plus extrêmes des Rangs Climatiques Mutuels locaux

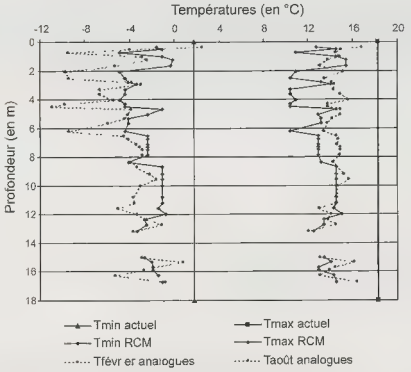


Figure 4. Comparaison des températures moyennes mensuelles minimales et maximales issues des méthodes du Rang Climatique Mutuel (cette étude) et des analogues (Rousseau, 1991). Les températures moyennes mensuelles minimales et maximales actuelles à Achenheim (Alsace, France) ont été figurées à l'aide d'une droite. La comparaison des deux méthodes via leurs courbes respectives fait nettement ressortir les points à améliorer sur les courbes du Rang Climatique Mutuel: paliers, et surestimation des températures minimales

DISCUSSION

Les estimations de Tmin et Tmax montrent des tendances similaires à celles reconstruites à partir de la méthode des analogues appliquée aux mêmes assemblages (Rousseau, 1991). D'une part, les paliers visibles sur les courbes du Rang Climatique Mutuel peuvent être supprimés en utilisant des Enveloppes Climatiques Spécifiques pondérées par le nombre de nœuds ayant les mêmes valeurs de couples (Tmin;Tmax). Cette pondération pourrait permettre le calcul d'une incertitude statistique qui serait certainement moindre que celle définie par les bornes du Rang Climatique Mutuel. D'autre part, les températures minimales, surestimées, peuvent être affinées par l'utilisation des distributions géographiques actuelles dans des régions plus froides comme la Russie. En outre, les reconstructions de la température minimale au Dernier Maximum Glaciaire (20000 ans BP) issues des comptages polliniques (-23 à -35°C) (Peyron *et al.*, 1998), et des modèles de Circulation Générale (10 à -20°C) pour le site de la Grande Pile (Vosges, France) (Kageyama *et al.*, 2001) confortent nos estimations pour Achenheim, et mettent en évidence la surestimation probable évoquée précédemment.

CONCLUSION

D'après cette étude, la méthode du Rang Climatique Mutuel peut être appliquée aux assemblages malacologiques, puisque le gradient thermique latitudinal européen et les variations thermiques majeurs du dernier cycle climatique ont pu être reconstruites. Toutefois, la procédure de reconstruction mérite d'être améliorée pour affiner les quantifications de températures et leur précision.

BIBLIOGRAPHIE

Akaike H., 1973. Information Theory and an Extension of the Maximum Likelihood Principle. *In:* Second International Symposium on Information Theory (B.N. Petrov & K. Csaki, eds.) 267. Akademiai Kiado, Budapest.

Armitage K. & Stinson D., 1980. Metabolic acclimation to temperature in a terrestrial snail. *Comparative Biochemistry and Physiology* **67A**: 135-139.

Atkinson T.C., Briffa K.R. & Coope G.R., 1987. Seasonal temperatures in Britain during the past 22,000 years, reconstructed using beetle remains. *Nature* **325**: 587-592.

Barnhart C.M. & Armitage K.B., 1979. Seasonal changes in the temperature affects oxygen consumption of a terrestrial snail. *Comparative Biochemistry and Physiology* **63A**: 539-541.

Chevallier H., 1982. Facteurs de croissance chez des gastéropodes pulmonés terrestres paléarctiques en élevage. *Haliotis* **12**: 29-46.

Guiot J., 1991. Structural characteristic of proxy data and methods for quantitative climate reconstruction. *In.* Evaluation of climate proxy data in relation to the European Holocene (B. Frenzel, ed.) 271-284. Special Issue ESF Project "European Palaeoclimate and Man" 1. Gustav Fisher, Stuttgart, Jena, New York.

Imbrie J. & Kipp N.G., 1971. A new micropaleontological method for quantitative paleoclimatology: application to a late Pleistocene Carribean core. *In:* The late Cenozoic glacial ages. (K.K. Turekian, eds.). 71-181. Yale University Press, New Haven.

Kageyama M., Peyron O., Pinot S., Tarasov P., Guiot J., Joussaume S. & Ramstein G., 2001 The Last Glacial Maximum climate over Europe and western Siberia: a PMIP comparison between models and data. *Climate Dynamics* **17**: 23-43.

Kerney M.P., Cameron R.A.D. & Jungbluth J.H., 1983 *Die Landschnecken Nord und Mitteleuropas*. P. Parey, Hamburg & Berlin.

Lambert M.C. & Daguzan J., 1987 Effet de la température et de la photopériode sur la croissance de Lymnea peregra (Müller) (Mollusque Gastéropode Pulmoné Basommatophore). *Haliotis* **16**. 31-40

Langley C.K., 1979 Thermal acclimation of a central neurone of Helix aspersa. I. Effects of temperature on electrolyte levels in the haemolymph. *Journal of Experimental Biology* **78**: 181-186

Le Calve D. & Daguzan J., 1989. Influence de la température d'incubation et du poids des oeufs sur la durée du développement embryonnaire et le poids des nouveaux-nés de l'escargot Petit-gris, Helix aspersa Muller (Gastéropode Pulmoné Stylommatophore) *Haliotis* **19**: 95-104.

Leemans R. & Cramer W., 1991 The IIASA Climate Database for mean monthly values of temperature, precipitation and cloudiness on a global terrestrial grid. International Institute of Applied Systems Analysis, Laxenburg.

Lozek V., 1964 Quartärmollusken der Tschechoslowakei. *Rozpravy Ustredniho Ustavu Geologickeho* **31**. 1-374

Peyron O., Guiot J., Cheddadi R., Tarasov P., Reille M., de Beaulieu J.-L., Bottema S. & Andrieu V., 1998 Climatic reconstruction in Europe for 18,000 yr B.P. from pollen data. *Quaternary Research* **49**. 183-196.

Rousseau D.-D., 1989 Réponse des malacofaunes terrestres quaternaires aux contraintes climatiques en Europe septentrionale. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* **69**: 113-124.

Rousseau D.-D., 1991 Climatic Transfer Function from Quaternary Molluscs in European Loess Deposits *Quaternary Research* **36**. 195-209.

Sacchi C. F. & Testard F., 1971. *Ecologie Animale - Organismes et Milieu*. Doin, Paris.

Etude de la résistance de l'huître *Crassostrea gigas* face à la protozoose à *Perkinsus marinus*

Bernard ROMESTAND [1] et Jean TORREILLES [1]*

ABSTRACT

Resistance of *Crassostrea gigas* against *Perkinsus marinus* parasite disease.

Experimental infections of *Crassostrea gigas* with *Perkinsus marinus* trophozoites show that the immune response against parasite proceeds through agents with α' chymotrysine activity The level of such activity increased from day 7 to 50 At day 7, the parasite burden decreased slowly whereas the hemagglutinin titer and plasmatic lectin level increased The agents seemed to play a protective role by enhancing the hemocyte phagocytic activity. After 50 days no oysters had detectable infection.

In vitro inhibitory effect of iron chelators on trophozoites proliferation suggested that parasite metabolism is iron dependent. Since nitric oxide donors such as S-nitrosoglutathion and sodium nitroprussiate promoted 56,7% and 50,6% inhibition on trophozoite proliferation, it appeared that nitric oxide generated by *C. gigas* hemocyte is involved in the anti pathogen activity of oysters

Unlike *C. virginica* which is very sensitive to perkinsiosis, *C. gigas* appears as a resistant species.

RÉSUMÉ

L'infestation expérimentale de l'huître *Crassostrea gigas* par des stades trophozoites de *Perkinsus marinus* met en évidence que la réponse immunitaire de l'hôte face au parasite fait intervenir des substances à activité protéasique de type α-chymotrypsine dont le taux plasmatique augmente à partir du 7ème jour A compter de cette date, la chute de la parasitémie se produit progressivement et l'on assiste à une augmentation du titre en hémagglutinines et du taux des lectines plasmatique La production de ces substances serait en faveur de leur rôle protecteur en renforçant probablement l'activité phagocytaire des hémocytes L'élimination des parasites étant totale au 50ème jour d'expérience.

In vitro, la prolifération des stades trophozoites dépendante du Fer (démontrée par l'effet desferrioxamine) est inhibée à 56,7% par le S-nitrosoglutathion et à 50,6% par le nitroprussiate Ces deux

[1] UMR 5098 DRIM (Défense et Résistance des Invertébrés Marins) CC/096 Université des Sciences et Techniques du Languedoc Place E. Bataillon 34095 Montpellier cédex 05, France *e-mail: <romestand@crit.univ-montp2.fr>

substances considérées comme donneurs de monoxyde d'azote (NO) apportent la preuve de l'implication de cet élément dans la lutte antiparasitaire.

Contrairement à l'espèce *C. virginica* rangée dans la catégorie des espèces sensibles à cette parasitose. *C. gigas* apparaît comme une espèce pouvant être considérée comme résistante à la protozoose à *P. marinus*.

INTRODUCTION

La perkinsiose à *Perkinsus marinus* est une pathogénie majeure de l'huître américaine *Crassostrea virginica*. Cette maladie connue depuis les années 1950 est responsable des fortes mortalités enregistrées dans les baies de Chesepeake et de Delaware sur la côte Est des Etats-Unis (Barreson et Ragone Calvo, 1996). Par contre, l'espèce *C. gigas*, est significativement plus résistante à *P. marinus* (Meyers *et al.*, 1991; Chu *et al.*, 1993; Barber et Mann, 1994; La Peyre *et al.*, 1995 a, b).

Le cycle biologique de *P. marinus* comprend trois stades parasitaires (Figure 1). le stade trophozoïte, le stade hypnospore et le stade zoospore biflagellé. La transmission de l'agent pathogène semble se réaliser directement d'huître à huître par le stade trophozoïte (en conditions d'élevage) cependant l'infestation naturelle pourrait être provoquée par le stade zoospore.

Les études des réactions hôte/parasite (Anderson, 1996, Chu, 1996; Garreis *et al.*, 1996; La Peyre *et al.*, 1996) ont montré que *C. virginica* est incapable de bloquer l'infestation parasitaire. Selon Faisal *et al.* (1999), les protéases libérées par le parasite seraient responsables de cette incapacité. De plus, Faisal *et al.* (1998) d'une part et Oliver *et al.* (1999) d'autre part ont montré que les inhibiteurs des protéases de *P. marinus* sécrétés par *C. gigas* sont plus actifs que ceux sécrétés par *C. virginica*. Enfin, Arumugan *et al.* (2000) ont rapporté que, comme les phagocytes de Vertébrés, les hémocytes d'huître sécrètent des agents cytotoxiques tels que les anions superoxydes et le monoxyde d'azote. De tels agents sont actifs contre les Protozooses, ainsi, Rubbo *et al.* (1994) ont mis en évidence une inhibition de la prolifération de *Trypanosoma cruzi* par le peroxynitrite résultant de la combinaison de O_2^- et NO, tandis que Rockett *et al.* (1991) d'une part et James et Glaven (1989) d'autre part, ont montré que la prolifération de *Plasmodium falciparum* et de *Schistosoma mansoni* est inhibée par le monoxyde d'azote qui se lie aux métaux de transition présents au niveau des sites actifs d'enzymes essentielles à la prolifération de ces parasites.

Les mécanismes de défense développés par *C. virginica* contre *P. marinus* de même que ceux développés par le parasite au cours de l'infestation sont encore mal connus. Aussi, l'étude de la résistance de *C. gigas* à l'infestation par *P. marinus* pourrait apporter des informations sur ces mécanismes.

Le but de notre étude est l'interprétation de la semi-résistance de *C. gigas* face à *P. marinus*, après infestation expérimentale d'huîtres, par l'analyse des variations de différents paramètres impliqués dans les réactions de défense: activités antiprotéases, rôle des lectines et des hémagglutinines, ainsi que le rôle joué par le monoxyde d'azote.

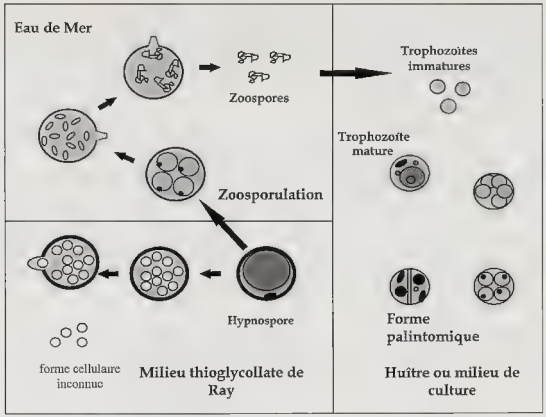


Figure 1. Cycle de vie de *Perkinsus marinus*.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Matériel biologique

Crassostrea gigas

Les huîtres retenues pour cette étude proviennent de l'étang de Thau (Sète France), elles sont maintenues en quarantaine pendant 2 semaines dans des bacs d'une capacité de 200 l d'eau de mer à 15°C et de salinité à 37‰ Une semaine avant l'inoculation, elles sont séparées en 2 groupes et transférées dans 2 bacs expérimentaux différents. Pendant toute la durée de nos expériences, les huîtres sont nourries 2 fois par semaine avec une algue vivante, *Tetraselmis suecica.*

Perkinsus marinus

Pour les infestations expérimentales: La souche de *Perkinsus* (isolat fourni gracieusement par le Dr M Faisal, Virginia Institute of Marine Science, USA.) est cultivée (culture en masse) pendant 6 semaines selon la méthode de La Peyre (1993) dans un milieu supplémenté de sérum de veau fœtal (Kleinschuster et Swink, 1993).

Pour l'étude de la prolifération parasitaire: Le milieu Dulbecco modifié Eagle (Gauthier et Vasta, 1993), DME/F 12 a été retenu pour le suivi de la prolifération parasitaire *in vitro.* Ce milieu est dépourvu de sérum de veau fœtal évitant ainsi une interférence avec les différentes substances ajoutées au milieu.

Quel que soit le milieu utilisé, avant leur utilisation les stades parasitaires (trophozoïtes) sont collectés et lavés 3 fois en solution tampon PBS pH=7.4. La viabilité cellulaire est mesurée par la technique d'exclusion au bleu trypan et le nombre de parasites est déterminé à l'aide de la cellule hématimétrique de Malassez.

Infestations expérimentales des huîtres

Quatre vingt dix individus retenus pour l'expérience sont infectés par inoculation sous 200,l de $1x10^6$ trophozoïtes (dilution en PBS) entre les 2 valves sans pénétrer dans les tissus (Bushek *et al.*, 1994) Le même nombre d'individus (90) reçoit seulement une injection de 200 µl de PBS (témoin négatif).

Après inoculation, les 2 lots expérimentaux sont laissés une nuit à sec pour faciliter la rétention des parasites puis remis dans l'eau de mer. Au cours des 2 mois d'expérience, 9 échantillonnages (1, 3, 7, 10, 14, 21, 28, 49 et 56 jours) ont été réalisés sur 5 individus de chaque lot. L'hémolymphe est prélevée dans le sinus du muscle adducteur. Sur chaque prélèvement sont effectués les déterminations: du titre en hémagglutinines, de l'activité anti-protéase et du taux de lectines.

Pour chaque individu, l'évolution du taux de parasites (intensité infectieuse) est évaluée par la technique de Ray (1952, 1966) Des prélèvements de branchies, de rectum et de manteau sont incubés dans du milieu RFTM (Ray 1952; Ray 1966). La teneur des échantillons en parasites est déterminée par la méthode de Mackin (1962) L'échelle de notation empirique est la suivante de 1 à 5 selon le barème suivant: 1 modérée (0 à 10^5 trophozoïtes/ml); 2 faible à modérée (10^5 à $3,2x10^5$); 3 modérée ($3,2x10^5$ à 10^6); 4 modérée à fort (10^6 à $3,2.10^6$); 5 fort (10^6 et plus);

Paramètres humoraux de défense

Titrage des hémagglutinines

La méthode utilisée est dérivée de la technique de Fisher et Di-Nuzzo (1991) avec quelques variantes. Pour chaque échantillon plasmatique, des séries de dilutions sont réalisées en PBS 9,55 g/l pH.7,5 du 1/100 au 1/204 800ème. 50 µl de chaque dilution est mélangé à 50 µl d'une suspension érythrocytaire de mouton à 0,5% dans des plaques de microtitration à fond rond. Un contrôle négatif est effectué en remplaçant le plasma par une solution de PBS. Après incubation des plaques 1 nuit à +4°C, le titre en hémagglutinines est déterminé par la plus forte dilution donnant une agglutination. Chaque test est réalisé en doublet.

Mesure de l'activité anti-chymotrypsine plasmatique

La méthode utilisée est celle décrite par La Peyre *et al.* (1995c), elle consiste en l'inhibition par le plasma des activités protéasiques de l'α chymotrypsine ou des protéases parasitaires (substrat: caséine marquée à la résorufine). Brièvement, 100µl d'une solution d'α-chymotrypsine (Sigma) est préincubée avec 100,µl de plasma d'huître pendant 30 mn à 37°C . Sur µl du mélange précédent sont additionnés à 50 µl d'une solution d'azocaséine à 0,04% (Boehringer, Mannheim) et incubés 3 h à 37°C. La réaction est arrêtée par addition de 480 µl d'acide trichloracétique (10 mn à 37°C) suivi d'une centrifugation pendant 5 mn à 2000 x g. L'absorbance est mesurée à 545 nm après addition de 400 µl d'un tampon Tris HC. 0,5 M pH=8,8. Par comparaison des activités

protéasiques d'une solution standard et des échantillons, le pourcentage d'inhibition est exprimé par rapport à la protéinémie qui a été déterminée préalablement par la méthode de Bradford (1976).

Pour la mise en évidence de l'activité plasmatique anti-protéasique parasitaire des huîtres la technique est identique à la précédente on remplace l'α-chymotrypsine de synthèse par les protéases parasitaires.

Dosage des lectines par compétition (C-ELLA)

Les puits d'une plaque ELISA NUNC Maxisorp sont additionnés par 50 µl d'une suspension de trophozoïtes à $0,125x10^6$ cellules/ml et incubés 1 nuit à 37°C. Le lendemain (*entre chaque étape 2 lavages en PBS sous 250 µl sont réalisés*), la plaque est saturée par une solution de PBS/BSA 1‰ (1 h à 37°C), pendant cette période, on effectue une préincubation des réactifs suivants: 100 µl de dilutions progressives de ConA (non conjuguée) (de 100 à 0,01 µg/ml^{-1}) gamme étalon ou 100 µl de plasma d'huîtres infectées ou non (réaction) additionnés à 100 µl de ConA conjuguée à la péroxydase (à la concentration de 0,25 µg/ml^{-1}). L'ensemble de ces réactifs est lassé en contact 1 h à température ambiante. Une dose de 50 µl de chaque mélange précédent est immédiatement déposée dans chacun des puits de la plaque et incubée 2 h à température ambiante. La réaction est arrêtée par 25 µl d'une solution d'H_2SO_4 4N et lue à 492 nm sur un lecteur de plaques Dynatech MR 5000.

Agents impliqués dans l'infestation parasitaire

Mise en évidence d'une activité protéasique de type α-chymotrypsine "like" dans le surnageant de culture de P. marinus

Après culture en masse des parasites pendant 6 semaines à température ambiante sur un milieu dépourvu de sérum de veau fœtal JLODRP3, le surnageant de culture est récupéré et concentré 30 fois sur système Filtron (seuil de coupure 10 KD) à +4°C. Une dialyse est réalisée contre du tampon acétate d'ammonium 50mM additionné de chlorure de calcium 10mM et 10% de sucrose pH=6,5 pendant 2 jours à +4°C. Le dialysat est purifié par chromatographie d'affinité sur colonne de bacitracine (Garreis *et al.*, 1996). La caractérisation enzymatique des fractions éluées a été réalisée par un test Apizym (Biomérieux).

Mise en évidence d'une action inhibitrice des chélateurs de fer sur la prolifération parasitaire (in vitro)

Dans des plaques stériles de 24 puits (Falcon 3047), 2 ml d'une suspension de trophozoïtes à $1x10^6$ cellules/ml sont introduits dans chaque puits au temps 0 (T_0) et mis à incuber à température ambiante. Certains puits sont utilisés comme témoins de croissance (trophozoïtes seuls) alors que dans d'autres les trophozoïtes sont mis en présence de différentes solutions de chélateurs de fer: desferrioxamine (10, 2,5 et 0,75 mM), cyanure de potassium, sulfo cyanure de sodium (1 mM, 100 et 10 µM). Le nombre de parasites est mesuré périodiquement (mesures en triplets) à (T+2, T+5 et T+8 jours) à la cellule de Malassez.

Mise en évidence d'une action inhibitrice des donneurs de NO sur la prolifération parasitaire (in vitro)

Dans des conditions expérimentales identiques à celles utilisées dans l'étude de chélateurs de fer, les suspensions de trophozoïtes sont additionnées à T0 de solutions de donneurs de NO: S nitrosoglutathion et nitroprussiate de potassium (1 mM, 100 et 10 µM). Pour les contrôles négatifs le glutathion oxydé et le ferricyanure de potassium (10, 100 et 1000 µM) sont utilisés à la place des donneurs de NO correspondants.

Calculs statistiques

A l'exception de l'intensité parasitaire qui a été calculée selon l'indice de Mackin (1962) pour chaque période de prélèvement la valeur moyenne des paramètres étudiés (activité antiprotéase, titre en hémagglutinines et taux de lectines) a été calculée pour les huîtres témoins et infectées, les valeurs portées sur les figures correspondent aux différences entre individus infectés et sains. Des tests de comparaisons des moyennes ont été effectués: test de Student ($p<0,05$), test de Fisher ($p<0,05$) ainsi que des analyses de régression. Le programme informatique Statview software (Abacus Concept) a été utilisé.

RÉSULTATS

Evolution de la parasitémie après infestations expérimentales

Comparativement aux individus témoins, l'évolution de la parasitémie des huîtres infectées, présente une augmentation lente et progressive jusqu'au jour 7 (Figure 2). Elle décroît lentement tout au long de l'expérience pour être finalement indétectable à 56 jours post infection. La mortalité des individus infectés reste faible (4 individus sur 90), aucune mortalité n'a été observée chez les individus témoins.

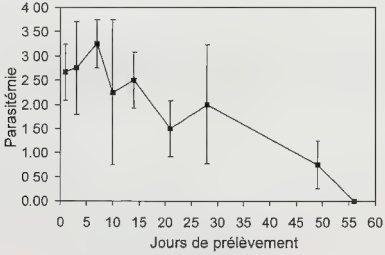


Figure 2 Evolution de la parasitémie après infestation expérimentale des huîtres *Notation selon l'echelle de MacKin (0: nulle; 1: faible; 2: faible à modérée; 3: modérée; 4: modérée à forte; 5: forte).*

Paramètres humoraux de défense

Evolution de l'activité antiprotéasique plasmatique (Figure 3)

Par Apizym nous avons pu mettre en évidence que les filtrats concentrés des surnageants de culture présentaient une activité protéasique de type α-chymotrypsine. A partir du 4ème jour de l'infestation, par comparaison avec les témoins, le taux de ces protéases plasmatiques des huîtres infestées, présente une augmentation significative. Celle ci se poursuit jusqu'au 7ème jour, puis on assiste à une décroissance assez brutale au 14ème jour et à une diminution plus lente par la suite pour atteindre une valeur nulle à j-27.

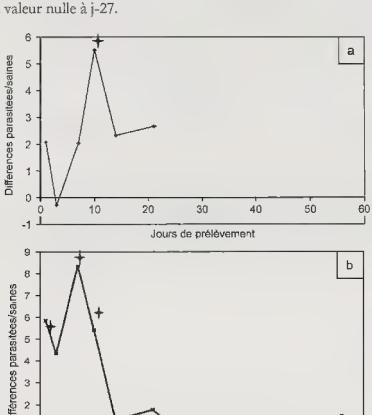


Figure 3. Evolution de l'activité antiprotéasique plasmatique après infestation expérimentale (différences huîtres saines et parasitées): a, contre les protéases parasitaires; b, contre l'α-chymotrypsine. + Significatif (test de Student).

Titre en hémagglutinines (Figure 4)

Au cours d'une première phase d'une durée de 5 à 6 jours, on assiste à une décroissance transitoire du titre en hémagglutinine plasmatique, suivie d'une augmentation significative dont le maximum est noté vers le 15ème ou le 16ème jour. Par la suite, on observe la décroissance rapide jusqu'au 25ème jour, à ce stade de l'expérience aucune différence significative n'est notée avec les individus témoins.

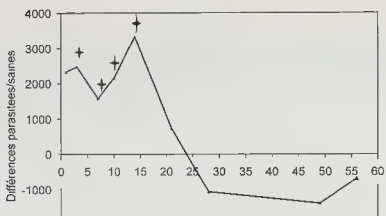


Figure 4 Evolution du titre en hémagglutinines (différences entre huîtres parasitées et huîtres saines) ┼ Significatif (test de Student)

Titrage des lectines (Figure 5)

Par comparaison des tests C-ELLA, effectués sur les plasmas d'huîtres saines et parasitées on peut mettre en évidence une activité inhibitrice des plasmas d'huîtres parasitées (différences significatives) dont le maximum se situe à 15 jours post-infection; par la suite, on assiste à une chute rapide de l'inhibition pour atteindre un taux identique au niveau basal à savoir au 20ème jour.

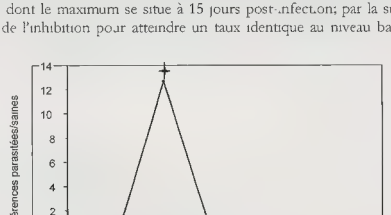


Figure 5 Evolution de la teneur en lectine (type ConA) dans le plasma des huîtres après infestation expérimentale. ┼ Significatif (test de Student).

Agents parasitaires impliqués dans l'infestation

L'infestation parasitaire provoque une augmentation de l'activité anti chymotrypsine du plasma. Cette activité peut être un élément de défense mis en jeu par l'huître puisqu'on observe que le surnageant du parasite contient une activité enzymatique de type α-chymotrypsine « like ». L'effet activité protéasique du parasite est inhibé par l'action antiprotéasique de l'hôte

Action de substances sur la prolifération parasitaire

Les chélateurs du Fer (Tableau 1)

Trois chélateurs du Fer ont été utilisés: la desferrioxamine, le cyanure et le sulfocyanure. Le tableau I met en évidence qu'après 192 h d'incubation, la desferrioxamine inhibe la prolifération des stades trophozoïtes de 50,6%, le cyanure de 50,4% et le sulfocyanure de 52,7%. Ici le Fer est donc nécessaire à la prolifération parasitaire

Tableau 1 Action des chélateurs du Fer (100µM) sur la prolifération des trophozoïtes de *P. marinus in vitro*.

Jours	Témoins	Desferrioxamine	Cyanure de potassium	Sulfocyanure de sodium
0	1,1*	1,04	1,06	1,03
	0 07**	0 05	0,08	0,04
2	1 49	1 24	1,27	1,3
	0,13	0,14	0,05	0,07
5	1 9	1,72	1,52	1,43
	0,13	0,05	0,09	0,01
8	3,3	1,63	1,62	1,56
	0,14	0,09 (-50,6)	0,12 (-50,4)	0,07 (-52,7)

* moyenne; ** déviation standard, entre parenthèse pourcentage d'inhibition (-) ou de stimulation (+) après 8 jours d'experience

Les donneurs de NO (Tableau 2)

Deux donneurs de NO ont été testés, le nitroprussiate de potassium et le S-nitroso glutathion. Dans le tableau II on observe que pour le nitroprussiate l'inhibition de la prolifération est de 55,8% et de 56,7% pour le S nitroso-glutathion. Ces valeurs peuvent être comparées à celles mesurées en présence de métabolites des donneurs utilisés dans notre expérimentation à savoir, le glutathion qui a une tendance à une augmentation de la prolifération parasitaire de 4%, et le ferricyanure de potassium qui produit une inhibition de la prolifération de 26,7% (valeur nettement inférieure à celle du nitroprussiate lui-même).

Tableau 2. Action des donneurs de NO (100µM) sur la prolifération des trophozoïtes de *P. marinus in vitro*.

Jours	Temoins	S-nitrosoglutathion	Glutathion oxydé	Nitroprussiate de potassium	Ferricyanure de potassium
0	1,1*	1,05	1,05	1,1	1 01
	0 ,7**	0,07	0,08	0,02	0,06
2	1,49	1,29	1,61	1,15	1,33
	0,13	0,04	0,07	0,07	0,11
5	1 9	1,40	2,15	1,32	2,09
	0,13	0,08	0,18	0,04	0,16
8	3,3	1 43	3,44	1,46	2,42
	0,14	0,11 (-56,7)	0,23 (+4)	0,06 (-55,8)	0,24 (-26,7)

* moyenne, ** déviation standard; entre parenthese pourcentage d' nh bition (-) ou de stimulation (+) après 8 jours d'experience

CONCLUSION

Les résultats relatifs à l'infestation expérimentale de *C. gigas* par les stades trophozoïtes de *P. marinus* nous permettent de faire ressortir plusieurs points intéressants sur la réponse de l'hôte face au parasite. Cette réponse fait intervenir 3 éléments actifs impliqués dans le système de défense qui semblent être étroitement liés.

En premier lieu des substances à activité anti-protéasique seraient synthétisées rapidement et libérées dans le plasma des huîtres infestées par *P. marinus* cette augmentation serait corrélée à la protéinémie de l'huître (résultats non présentés) Immédiatement après production de ces substances la parasitémie commence à chuter, il semblerait que les anti-protéases pourraient jouer un rôle sur l'évolution de la concentration en parasites en contrôlant le pouvoir pathogène de celui ci. Ce résultat est à mettre en relation avec les travaux de La Peyre *et al.* (1996) et de Garreis *et al.* (1996) qui ont pu mettre en évidence le rôle des protéases parasitaires dans la propagation des parasites *in vivo* ces dernières ayant un effet immunosuppresseur sur l'hôte. Les anti protéases de *C. gigas* de type α-chymotrypsine "like" auraient une activité supérieure à celles développées par *C. virginica* (Faisal *et al.*, 1998) et pourrait expliquer en partie la résistance de cette espèce à l'infestation par *P. marinus*.

Le deuxième aspect de l'immunité de *C. gigas* développé contre *P. marinus* implique les hémagglutinines et les lectines. L'augmentation du titre en hémagglutinines observée immédiatement après le pic d'anti-protéases est également en faveur du rôle protecteur joué par ces dernières dans l'action immunosuppressive des protéases parasitaires. Cette augmentation de l'activité agglutinante est corrélée à la chute de la parasitémie, ce résultat a également été observé par La Peyre *et al.* (1995a) qui suggère une relation de cause à effet entre l'augmentation de l'activité phagocytaire des hémocytes et celle du titre en hémagglutinine plasmatique. La stimulation par l'huître d'une production accrue d'une ou plusieurs lectines pouvant se fixer sur le stade trophozoïte du parasite apporte la preuve que *C. gigas* a la possibilité d'opsoniser les stades infestants (trophozoites) et renforcerait la phagocytose par les hémocytes. D'après La Peyre *et al* (1995b), l'augmentation de l'indice phagocytaire des hémocytes aurait pour conséquence une décroissance rapide de la parasitémie.

Enfin une intervention du NO sur la prolifération des parasites semble également impliquée dans le mécanisme de défense. Le parasite est sensible aux éléments donneurs de NO qui sont susceptibles de se combiner aux métalloprotéines (substances riches en Fer) présentes dans les sites actifs d'enzymes essentielles à la prolifération parasitaire et pourraient les inhiber .

En conclusion, *C. gigas* est une espèce qui peut être réellement considérée comme résistante au parasite *P. marinus*, car elle paraît développer une réponse immunitaire assez élaborée qui pourrait s'échelonner dans le temps de la manière suivante:

- hémagglutinines et lectines produites en plus grande quantité pourraient stimuler la phagocytose des trophozoïtes.

anti-protéases capables de neutraliser les protéases parasitaires et de limiter le pouvoir pathogène du parasite.

- monoxyde d'azote parachevant toutes ces actions par une inhibition des mitoses et donc de la prolifération parasitaire par blocage des sites actifs des enzymes indispensables au métabolisme des parasites.

BIBLIOGRAPHIE

Anderson R S. 1996 Interactions of *Perkinsus marinus* with humoral factors and hemocytes of *Crassostrea virginica*. *Journal of Shellfish Research* **15**: 127-134.

Arumugan M, Romestand B, Torreilles J. & Roch P 2000 In vitro production of superoxyde and nitric oxide (as nitrite and nitrate) by *Mytilus galloprovincialis* haemocytes upon incubation with PMA or laminarin or during yeast phagocytosis. *European Journal of Cell Biology* **79**. 513-519.

Barber B J & Mann R., 1994. Growth and mortality of eastern oysters, *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791), and pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) under challenge from the parasite, *Perkinsus marinus* *Journal of Shellfish Research* **13**: 109-114

Bradford M M., 1976. A rapid and sensitive method quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72** :248-254

Burreson E M & Ragone Calvo L.M, 1996 Epizootiology of *Perkinsus marinus* disease of oysters in Chesapeake bay, with emphasis on data since 1985. *Journal of Shellfish Research* **15**. 17-34.

Bushek D., Allen S.K., Alcox K.A., Gustafson R & Ford S., 1994. Dose response of the eastern oyster, *Crassostrea virginica*, to cultured cells of *Perkinsus marinus*, the agent of Dermo disease. *Journal of Shellfish Research* **13**: 313.

Chu F.L.E., 1996 Laboratory investigations of susceptibility, infectivity, and transmission of *Perkinsus marinus* in oysters. *Journal of Shellfish Research* **15**: 57-66.

Chu F.L E, La Peyre J F. & Burreson C S, 1993. *Perkinsus marinus* infection and potential defense related activities in eastern oysters, *Crassostrea virginica*: salinity effects. *Journal of Invertebrate Pathology* **62**. 226-232.

Faisal M, Mcintyre E A, Adham K G., Tall B D., Kothary M H. & La Peyre J F, 1998. Evidence for the presence of protease inhibitors in eastern (*Crassostrea virginica*) and pacific (*Crassostrea gigas*) oysters *Comparative Biochemistry and Physiology, series B* **121**: 161-168.

Faisal M. Schafhauser D.Y Garreis K.A. Elsayed E & La Peyre J.F., 1999 Isolation and characterisation of *Perkinsus marinus* proteases using bacitracin-sepharose affinity chromatography *Comparative Biochemistry and Physiology, series B* **123**: 417-126.

Fisher W S & Di Nuzzo A.R., 1991 Agglutination of bacteria and erythrocytes by serum from six species of marine molluscs. *Journal of Invertebrate Pathology* **57**: 380-394

James S.L & Glaven J., 1989. Macrophage cytotoxicity against shistosomula of *Schistosoma mansoni* involves arginine-dependent production of reactive nitrogen intermediates. *Journal of Immunology* **143**: 4208-4212

Garreis K.A., La Peyre J F, & Faisal M., 1996. The effects of *Perkinsus marinus* extracellular products and purified proteases on oyster defence parameters *in vitro*. *Fish & Shellfish Immunology* **6** 581-597.

Gauthier J.D. & Vasta G.R., 1993. Continuous *in vitro* culture of the eastern oyster parasite *Perkinsus marinus*. *Journal of Invertebrate Pathology* **62**: 321-323.

Kleinschuster S.J. & Swink S L.,1993. A simple method for the *in vitro* culture of *Perkinsus marinus* *The Nautilus* **107**: 76-78

La Peyre J F , 1993 Studies on the oyster pathogen *Perkinsus marinus* (Apicomplexa)· Interactions with host defences of *Crassostrea virginica* and *Crassostrea gigas* and *in vitro* propagation Ph D dissertation, The College of William and Mary, Williamsburg, Virginia.

La Peyre J F , Chu F L E , & Meyers J A , 1995a Haemocytic and humoral activities of eastern and pacific oysters following challenge by the protozoan *Perkinsus marinus Fish & Shellfish Immunology* **5**· 179-190

La Peyre J F , Chu F L.E. & Vogelbein W.K , 1995b. *In vitro* interactions of *Perkinsus marinus* with hemocytes from eastern and pacific oysters, *Crassostrea virginica* and *Crassostrea gigas Journal of Shellfish Research* **11**. 200.

La Peyre J F , Schafhauser D Y , Rizkalla E M & Faisal M , 1995c Production of serine proteases by the oyster pathogen *Perkinsus marinus* (Apicomplexa) *in vitro*. *The Journal of Eukaryotic Microbiology* **42** 544-551

La Peyre J F , Yarnall H A & Faisal M , 1996 Contribution of *Perkinsus marinus* extracellular products in the infection of the Eastern oysters (*Crassostrea virginica*). *Journal of Invertebrate Pathology* **68** 312-313

Mackin J G , 1962 Oyster disease caused by *Dermocystidium marinum* and other microorganisms in Louisiana *Publications of the Institute of Marine Science, University of Texas*, **7**. 132-229

Meyers J A , Burreson E M , Barber B J & Mann R., 1991. Susceptibility of diploid and triploid pacific oysters, *Crassostrea gigas*, to *Perkinsus marinus*. *Journal of Shellfish Research* **10**· 433-437

Oliver J.L., Lewis T.D., Faisal M. & Kaattari S.L., 1999. Analysis of the effects of *Perkinsus marinus* proteases on plasma proteins of the eastern oyster (*Crassostrea virginica*) and the pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Journal of Invertebrate Pathology* **74**: 173-183.

Ray S M , 1952 A culture technique for the diagnosis of infection with *Dermocystidium marinum* Mackin, Owen and Collier in oysters. *Science* **116**: 360-361

Ray S.M , 1966 A review of the culture method for detecting *Dermocystidium marinum*, with suggested modifications and precautions. *Proceedings of the National Shellfisheries Association* **54**. 55-69

Rockett K.A., Kwiatkowski D., Bate C.A., Awburn M.M., Rockett E.J. & Clark I.A., 1991. In vitro induction of nitric oxide by an extract of *Plasmodium falciparum*. *Journal of Infection* **32**. 187-196.

Rubbo H , Denicola A & Radi R , 1994 Peroxynitrite inactivates thiol containing enzymes of *Trypanosoma cruzi* energetic metabolism and inhibits cell respiration *Archives of Biochemistry and Biophysics* **308** 96-102

Past and present geographical distribution of populations of Portuguese (*Crassostrea angulata*) and Pacific (*C. gigas*) oysters along the European and north African Atlantic coasts

*Caroline FABIOUX [1,2], Arnaud HUVET [1,2], Sylvie LAPÈGUE [1], Serge HEURTEBISE [1] and Pierre BOUDRY [1]**

ABSTRACT

Today, it is commonly accepted that *C. angulata* and *C. gigas* are a single species according to morphological, genetic and experimental hybridization data. Following the viral disease that affected *C. angulata* and the subsequent expansion of *C. gigas* in Europe, it was of interest to examine the geographical distribution of both taxa in Europe. We studied the genetic composition of seventeen populations of cupped oysters, sampled in France, Spain, Portugal, Morocco and Italy, using a diagnostic marker, the mitochondrial Cytochrome Oxydase I gene. Results showed two distinct geographical zones. All the populations located in the northern part of the European sampled zone were mainly composed of *C. gigas* haplotypes whereas populations from southern Europe and Morocco were mainly composed of *C. angulata* haplotypes. No natural populations were found between Coruña (northern Spain) and Lisbon (western Portugal). Very limited mixtures of the two taxa were observed in France and northern Spain, which might correspond to ancestral polymorphism and suggest the past presence of *C. angulata* in these regions. However, some notable mixtures were observed in the south of Portugal. This could be the result of importation of *C. gigas* spat to this region. These results indicate a recent change in genetic composition of populations in southern Portugal and show that human activities have created contact zones between the two taxa although no natural sympatric zones exist in Europe.

RÉSUMÉ

Distribution géographique passée et présente de populations de l'huître portugaise (*Crassostrea angulata*) et de l'huître japonaise (*C. gigas*) le long des côtes européennes et nord-africaines.

Les deux huîtres creuses *Crassostrea gigas* et *Crassostrea angulata* sont aujourd'hui communément classées dans la même espèce du fait de leur similarité morphologique et génétique et de leur hybridation en conditions expérimentales. La forte expansion de *C. gigas* en Europe ayant succédée à la disparition des

[1] Laboratoire de Génétique et Pathologie, IFREMER, F-17390 La Tremblade, France (* *Corresponding author*)
[2] Present address: Unité Mixte de Recherche Physiologie et Ecologie des Mollusques, IFREMER, B.P. 70, F-29280 Plouzané, France.

populations de *C. angulata*, affectées par une infection virale, il était intéressant d'étudier la distribution actuelle des deux taxons d'huîtres en Europe. Dans la présente étude, la composition génétique de dix-sept populations d'huîtres creuses échantillonnées en France, en Espagne, au Portugal, au Maroc et en Italie, a été analysée avec un marqueur diagnostique, le gène mitochondrial de la Cytochrome Oxydase I. Deux zones géographiques distinctes ont ainsi été mises en évidence. Toutes les populations, situées dans le nord de la zone échantillonnée en Europe, sont principalement constituées par des haplotypes *C. gigas*. Inversement, les populations sud européennes et Marocaines sont principalement composées d'haplotypes *C. angulata*. Aucune population sauvage d'huître creuse n'a été trouvée entre La Corogne (Nord Espagne) et Lisbonne (Ouest Portugal). Les résultats ont montré de très faibles mélanges des deux taxons dans quelques populations en France et dans le nord de l'Espagne qui pourraient être imputés à du polymorphisme ancestral suggérant l'ancienne présence de *C. angulata* sur ces côtes. Néanmoins, des mélanges notables des deux taxons ont été observés dans le sud du Portugal où la présence de *C. gigas* résulterait d'importations de naissain dans cette région. Cette étude suggère une récente modification de la composition génétique des populations dans le sud du Portugal et montre que les activités humaines ont créées des zones de contact entre les deux taxons alors qu'aucune zone naturelle de sympatrie n'a été mise en évidence en Europe.

INTRODUCTION

The two cupped oysters *Crassostrea gigas* and *Crassostrea angulata* were first described respectively by Thunberg in Japan in 1793 and by Lamarck in Portugal in 1819. Discovered on the opposite sides of the world, they were initially described as two different species. However, their taxonomic status had been debated for a long time and they are now commonly classified as single species (Menzel, 1974; Huvet *et al.*, 2002). The definitions of a species in the biological species concept are multiple but are mainly based on three criteria: similarity, descent and interfertility (Mayr, 1963; Lherminer and Solignac, 2000). The two taxa have indistinguishable prodissoconch and adult shells (Ranson 1948; Ranson 1960). Experimental hybridizations and fertility of hybrids showed the absence of reproductive barriers (Gaffney and Allen, 1993; Huvet *et al.*, 2001; Huvet *et al.*, 2002). All these data support the grouping of *C. gigas* and *C. angulata* within a single species, as proposed by Menzel (1974). Several studies based on allozyme markers, showing no genetic differentiation between populations of the two taxa are also concordant with a single species (Mathers *et al.*, 1974; Buroker *et al.*, 1979; Mattiucci and Villani, 1983). However, differences between the karyotypes of the two taxa were observed, notably for chromosome pair 7, but these data do not disagree with the close genetic identity of both taxa (Leitão *et al.*, 1999 *a,b*). Two studies on the Cytochrome Oxydase I (COI) mitochondrial gene (O'Foighil *et al.*, 1998; Boudry *et al.*, 1998) also showed significant genetic differences between *C. gigas* and *C. angulata* populations. This locus was considered as a diagnostic marker of the two taxa (Boudry *et al.*, 1998 and Huvet *et al.*, 2000) because the PCR-RFLP (Polymerase chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism) technique revealed haplotypes specific for each taxon. Other small but significant nuclear genome differences between *C. gigas* and *C. angulata* populations were revealed using microsatellite markers (Huvet *et al.*, 2000). Lastly, *Crassostrea gigas* was shown to have a superior production yield in the natural environment in France (His, 1972; Héral *et al.*, 1986), and a growth rate twice as high as the one observed for the Portuguese oyster (Bougrier *et al.*, 1986). Differences were also revealed in terms of their ecophysiological characteristics (filtration: His, 1972; oxygen consumption: Goulletquer *et al.*, 1999).

Mitochondrial gene analyses revealed the Asian origin of *C. angulata* (O'Foighil *et al.*, 1998, Boudry *et al.*, 1998) and, more precisely, its probable introduction from Taiwan to Portugal by commercial ships in the 16th or 17th century. Introduced from Portugal to French Atlantic coasts in 1868 (Lambert *et al.*, 1929; Cochard and Dardignac, 1977), *C. angulata* spread rapidly and became the principal farmed oyster species in France, with a yearly production of up to 100 000 tons. However, in the early 1970s, an iridovirus infection resulted in major mortality (Comps, 1970) that decimated French cultivated stocks of *C. angulata*. The same symptoms also affected populations in Portugal (Ferreira and Dias, 1973). To sustain the oyster industry, *C. gigas* was imported from Japan and Canada into France in the early 1970's (Grizel and Héral, 1991). *Crassostrea gigas* then settled widely along the Atlantic coast and became the main cultivated oyster in Europe with a yearly production of over 150 000 tons. Following the viral disease that affected *C. angulata* and the subsequent expansion of *C. gigas*, the present distribution of remaining populations of *C. angulata* in Europe was poorly known and only a few populations were known to exist in southern Portugal (Boudry *et al.*, 1998, Huvet *et al.*, 2000). The aim of the present study was therefore to further document the present genetic composition of cupped oyster populations in Europe and, more precisely, to find out to what extent mixed populations (composed by *C. gigas* and *C. angulata*) exist along the Atlantic coasts.

MATERIAL AND METHODS

Biological material

Wild oyster samples were collected from 16 locations along a geographical north-south gradient from French to Moroccan coasts plus from one Mediterranean location (Table 1, Figure 2). Oysters of the sixteen sampled populations come from natural spat collection. Each sample was represented by an abbreviation of three capital letters. The northern part of the studied area was represented by 4 French populations from Brest (ROZ) to Vieux Boucau (BOU). Seudre (SEU) and Arcachon (ARC) populations are located in the two main oyster farming regions in France. Five populations were sampled in Spain. Four of these were taken along the northern coast at Orio (ORI), Islares (ISL), Ribadesella (RIB) and Castropol (CAS), and one in the south near Cadiz (CAD). As far as we know, Castropol is the only Spanish location where oyster farming activities are developed. The sampling transect was interrupted from Corona (northern point of Spain) to Porto (western Portugal) because no cupped oysters could be found in this zone. In southern Portugal, 5 sites were sampled from Setubal (SET1) to Rio Formosa (RFA). Two other populations were sampled along the Atlantic coast in Morocco: Oualidia lagoon (OUA) and Tahaddart (TAH). Finally, one Mediterranean population was sampled in Italy, near Venice (VEN). Six out of these 17 populations (see Table 1: SEU, ARC and BOU in France, RFA and MIR in Portugal and CAD in Spain) were previously studied, using COI and microsatellite markers (Huvet *et al.*, 2000). In total, 732 individuals (16 to 50 per population) were sampled and analysed.

Mantle or gills of each sample were dissected and preserved in 95% ethanol before DNA extraction.

Table 1 Location, sample size (N) and genetic composition (*Crassostrea gigas* and/or *C. angulata*) of the 17 populations sampled in Europe and North Africa.

Country	Location	Latitude and longitude	Abbreviation	Taxa	N
France	Roz estuary, Brest	48°N 3°W	ROZ	*C. gigas*	50
	Seudre Estuary *	45 °N 1°W	SEU	*C. gigas*	49
	Arcachon Bay *	44°N1°W	ARC	*C. gigas*	50
	Vieux-Boucau Bay *	43°N 1°W	BOU	*C. gigas / C. angulata*	49
Spain	Orio	43°N 2°W	ORI	*C. gigas*	50
	Islares	43°N 3°W	ISL	*C. gigas*	48
	Ribadesella, Gijon	43°N 5°W	RIB	*C. gigas / C. angulata*	50
	Castropol	43°N 7°W	CAS	*C. gigas*	45
	Cadiz*	36°N 6°W	CAD	*C. angulata*	44
Italy	Venice	45°N 12°W	VEN	*C. gigas / C. angulata*	39
Portugal	Setubal	38°N 8°W	SET1	*C. angulata*	50
	Rio Mira Estuary *	37°N 8°W	MiR	*C. angulata*	30
	Barrinha-Faro	37°N 7°W	BAR	*C. angulata / C. gigas*	42
	Tavira	37°N 7°W	TAR	*C. angulata / C. gigas*	40
	Ria Formosa *	37°N 7°W	RFA	*C. angulata / C. gigas*	35
Morocco	Tahaddart	35°N 6°W	TAH	*C. angulata / C. gigas*	16
	Oualidia lagoon	32°N 9°W	OUA	*C. gigas / C. angulata*	45

(*) Previously determined in Huvet *et al.* (2000)

Mitochondrial DNA analysis

DNA was extracted by the Phenol/Chloroform method (Moore, 1993). A DNA fragment was amplified by PCR using primers described by Banks *et al.* (1993) and Folmer *et al.* (1994) and under conditions used by Boudry *et al.* (1998). The mitochondrial amplified fragment was 710 bp in length and corresponded to the Cytochrome Oxydase C subunit I (COI) gene. Restriction reactions were performed on DNA fragments with 4 polymorphic endonucleases (*Taq*I, *Sau*3A, *Hha*I and *Mse*I) following conditions in the protocol of Boudry *et al.* (1998).

RESULTS

Six different haplotypes, previously named A, B, C, D, E and J (Boudry *et al.*, 1998), were observed in the studied populations. Two haplotype clusters (Figure 1) can be distinguished, haplotypes C and E were associated with *C. gigas* and haplotypes A, B, D and J with *C. angulata* (Boudry *et al.*, 1998; Huvet *et al.*, 2000). The frequencies of these 6 haplotypes in the 17 populations studied are presented in Table 2. The geographical distribution of the *C. gigas* specific haplotypes (C and E) and of the *C. angulata* specific haplotypes (A, B, D and J) is also presented in Table 1 and graphically in Figure 2.

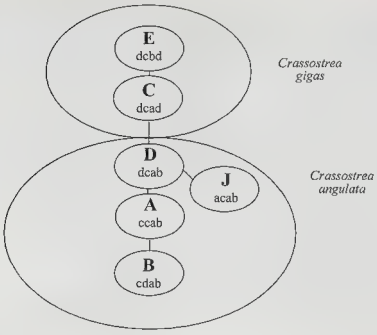


Figure 1. Minimum spanning tree of RFLP haplotypes at the COI marker (Boudry *et al*, 1998) and their taxonomic specificity among *C. gigas* (C and E) and *C. angulata* (A, B, D and J). Small letters correspond to profiles obtained with the four restriction endonucleases, *Taq*I, *Sau*3A, *Hha*I and *Mse*I respectively. Each circle is separated from adjacent circles by a single restriction site.

Table 2. Haplotype frequencies in each population.

			Haplotypes					
Country	Population	N	A	B	C	D	E	J
France	ROZ	50			0.96		0 04	
	SEU	49			0 98		0 02	
	ARC	50			0 98		0.02	
	BOU	49	0 08		0 90		0 02	
Spain	ORI	50			0.98		0 02	
	ISL	48			1			
	RIB	50	0 04		0 93		0 03	
	CAS	45			1			
	CAD	50	0 96	0 02		0.02		
Italy	VEN	39			0 92			0.08
Portugal	SET1	50	0.94					0.06
	MIR	30	1					
	BAR	42	0 83	0 1	0 05			0.02
	TAR	40	0 72		0 23			0 05
	RFA	35	0 86	0 03	0 11			
Morocco	TAH	16	0 87	0 13				
	OUA	45	0.1		0.85		0 05	

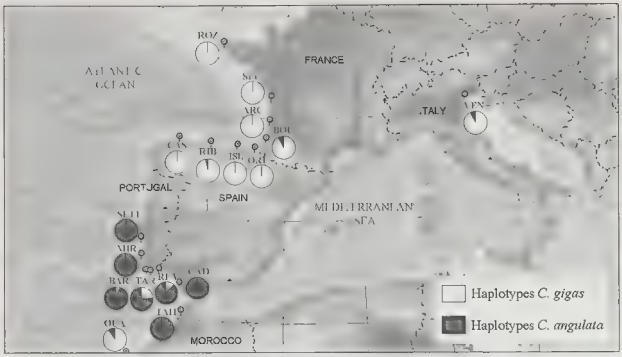


Figure 2. Specific haplotype frequencies of the 17 populations of *Crassostrea gigas* and *C. angulata* sampled in Europe and north Africa. For each population, a pie chart presents the frequencies of haplotypes associated with *C. gigas* (light grey) and *C. angulata* (dark grey).

Populations located in the northern part of the sampled zone (in France: ROZ, SEU and ARC; in northern Spain: ORI, ISL and CAS) showed high frequencies of haplotype C (ranging from 0.90 to 1), associated with low frequencies of haplotype E (ranging from 0.02 in 0.04). Two populations appeared to be monomorphic for haplotype C (ISL and CAS). Two populations, BOU in France and RIB in northern Spain, also showed high frequencies of haplotype C and low frequencies of haplotype E, but haplotype A, known to be specific to *C. angulata* (Boudry *et al.*, 1998) was also present at low frequencies (0.08 and 00.4 respectively). Similarly, the Mediterranean population VEN was mainly composed by haplotype C (0.98), but haplotype J was also observed at a low frequency (0.08).

Conversely, in southern Portugal and southern Spain, all the sampled populations showed high frequencies of haplotype A (ranging from 0.72 to 1), and low frequencies of haplotypes B, D or J. MIR was the only sample to be monomorphic for haplotype A. Three populations (RFA, TAR and BAR) also displayed low to medium frequencies of haplotypes C (0.05 to 0.23) or E (0.02 to 0.05), known to be specific to *C. gigas*.

Further south, the two Moroccan samples (OUA and TAH) were found to be very different from each other. The most southern sample (OUA), showed a genetic composition similar to populations RIB and BOU, *i.e.* a high frequency of haplotype C (0.85) with low frequencies of haplotypes E (0.05) and A (0.1). Conversely, TAH, showed a genetic composition similar to southern Portuguese and southern Spanish samples, with a high frequency of haplotype A (0.87) and a low frequency of haplotype B (0.13).

DISCUSSION

Past and present geographic distribution of C. angulata *and* C. gigas

Based on the observed haplotype frequencies, two distinct geographical zones can be outlined From the French to the northern Spanish coasts (ROZ to CAS in Figure 2), *C. gigas* appears to be the dominant taxon. In this area, only 6 out of 391 individuals were found with *C. angulata* specific haplotypes. In France, the viral disease that affected *C. angulata* in the early 1970's, followed by the successful introduction of *C. gigas* and the subsequent development of the farming of this taxon is a likely explanation of this current situation. Indeed, the large-scale importation of *C. gigas* from Japan and Canada led to a fast extension of the *C. gigas* cultivated stocks along the French coasts (Barré, 1981). Furthermore, Marennes-Oléron and Arcachon bays are the two main areas for spat collection and this seed supply is the basis of oyster production in France Up to now, no data were available about the genetic composition of cupped oyster populations along Spanish coasts. Our results showed that *C. gigas* is the dominant taxon in the populations sampled in the northern Spain as observed in France. Unlike the French situation, the significant presence of *C. gigas* in northern Spain cannot be explained by human activities, because no oyster farming has been developed in this region, except in Castropol (CAS) In northern Spain, oyster populations could have resulted from settlement of larvae originating from southern coasts of France. Larvae could follow marine currents and spread along the northern Spanish coast from one favourable site to another Only two populations, Vieux-Boucau (BOU) in the south of France and Ribadesella (RIB) in the north of Spain, showed a low frequency of the *C. angulata* haplotype A, with a large majority of *C. gigas* haplotypes. The absence of *C. gigas* oyster farming in these two sites might explain the persistence of rare *C. angulata* haplotypes and indicate the past presence of *C. angulata* in these regions.

Concerning the Italian population (VEN), it is known that cupped oysters were first imported from France into Italy in 1966. At this time, the first spat from Japan had probably already been introduced to the Bay of Marennes-Oléron (Grizel and Héral, 1991) so the taxonomic nature of these introduced oysters was unsure (Biocca and Matta, 1982). Our sample is mainly composed of the *C. gigas* haplotype C (0.92) but haplotype J is also present at low frequency (0.08). Haplotype J is also present, at low frequencies, in three of our Portuguese samples (SET1, BAR and TAR) and was previously reported in Taiwanese *C. angulata* populations (Huvet *et al.*, 2000). It was also observed on the French Atlantic coast, but only for a single individual (Boudry *et al.*, 1998). Haplotype J can therefore be considered to be specific to *C. angulata*. As a consequence, our Italian sample could have a genetic composition similar to the BOU and RIB samples; *i.e.* a majority of *C. gigas* with a low frequency of *C. angulata*. The fact that haplotype J is present but not haplotypes A or B could be due to genetic drift.

The second geographical area identified in this study is composed of southern Portugal and southern Spain (SET1 to CAD in Figure 2). In this region, samples show high frequencies of *C. angulata* haplotypes. This area represents the remaining populations of *C. angulata* in Europe and is most probably much more limited than it was before the beginning of the 1970s. To date, according to the statistics of the Food and Agriculture Organization (FAO, 1999) only Portugal produces *C. angulata* oysters (618 tons in 1997). Nevertheless, the presence of *C. gigas* was detected in three sites along the southern European coasts in Tavira, Rio Formosa and Barrinha

Faro. The level of *C. gigas* in the mixture is limited (less than 25%), but significantly higher than the *C. angulata* observed in the *C. gigas* populations in northern Europe.

An interesting situation is observed in the two Moroccan populations. The northern population, Tahaddart (TAH), showed only *C. angulata* haplotypes whereas the southern population, Oualidia (OUA), was dominated by *C. gigas* ones. Moroccan lagoons have been reported to host natural oyster beds of *Ostrea edulis*, *Ostrea stentina* and *Crassostrea angulata* (Dollfus, 1934, Collignon, 1960 and Beaubrun, 1976). Moreover, *C. angulata* spat had been imported into Morocco from Spain and Portugal from 1952 (Shafee, 1985). They were farmed in coastal waters up to marketable size. But oyster farmers preferred to cultivate the Pacific oyster because it gave a higher yield than other species (Shafee and Sabatie, 1986). In Oualidia, the culture of *C. gigas* has been developed since 1972 and is based on spat importation from France (Shafee and Sabatie, 1986), and more precisely from Arcachon bay (A. Gérard, pers. com.). The genetic composition of the Oualidia sample could therefore be considered as a result of the recent development in oyster farming. Conversely, the Tahaddart population has remained in its "original" genetic composition, *i.e. C. angulata*. These data confirm the past presence of *C. angulata* along the coasts of northern Africa. The highly contrasted genetic composition between populations separated by less than 200 kilometres implies a very limited gene flow between Oualidia and Tahaddart since *C. gigas* was introduced into Morocco. A fine scale study of *Crassostrea* populations in Morocco, for example in the estuary of the Sabou Wadi where *Crassostrea* populations were previously described (Pasteur-Humbert, 1962) would document the genetic differentiation of the populations of the two taxa in northern Africa.

No natural zone of sympatry of the two taxa in Europe

The geographical distribution of the two taxa (i.e. *C. gigas* in northern Europe and *C. angulata* in southern Europe) (Figure 2) would allow us to suppose the existence of a zone of sympatry on the northern coast of Portugal and Galicia. However, despite our efforts, no cupped oysters could be found from Corona (northern Spain) to Lisbon (Portugal). The apparent absence of cupped oysters in this area implied that there would be no natural sympatric zone for *C. gigas* and *C. angulata* in Europe. Different hypotheses, based on ecological and/or hydrodynamic factors, could explain the absence of oysters in northern Portugal and Galicia. Tidal or surface currents could prevent larvae from migrating and/or settling. It is known that larval dispersion of such species can exceed 100 kilometres (Cameron, 1986; Butman, 1987) but more than 800 kilometres separate the northern *C. gigas* populations from the southern *C. angulata* populations. Another hypothesis is that the habitat in this area (*i.e.* environmental factors such as temperature, salinity, trophic level, pollution) could be unsuitable for larval fixation. However, this hypothesis is improbable because both mussels (*Mytilus galloprovincialis*) and flat oysters (*Ostrea edulis*) are present in this region. Our study shows that, unlike mussel populations of *Mytilus edulis* and *M. galloprovincialis* that are naturally mixed in Europe (Cousteau *et al.*, 1991; Daguin *et al.*, 2001), no natural zone of sympatry is observed in Europe for *C. gigas* and *C. angulata*.

Impact of oyster farming on wild* C. angulata *populations

In our study, a few populations showed both taxa together (up to 23% of haplotype C in the *C. angulata* population of Tavira, southern Portugal). This situation could be the result of the development of oyster farming in this area. Indeed, transportation of oysters and, more precisely, importation of *C. gigas* spat into the south of Portugal supports the increasing oyster production in Portugal. This has created an "artificial" contact zone between *C. gigas* and *C. angulata* in southern Portugal. A similar situation, even more pronounced than in Tavira, can be found in Morocco where oyster culture might be at the origin of the high frequency (0.9) of *C. gigas* haplotypes in the Oualidia population. In Tahaddart (TAH) where no oyster farming was reported, only *C. angulata* haplotypes were observed. These results show that increasing frequencies of *C. gigas* in populations seem to be correlated with oyster culture. It can be concluded that a natural sympatric zone does not seem to exist in Europe for the two taxa but some contact between *C. gigas* and *C. angulata* is created in southern Europe by human activities (i.e transportation of *C. gigas* spat and oysters for shellfish industries in development in these regions). These mixed populations would be of great interest for the study of hybridization processes between *C. gigas* and *C. angulata*. Indeed, as *C. gigas* and *C. angulata* were totally interfertile under controlled conditions (Huvet *et al.*, 2002), we could except some natural hybridization in populations where they are in contact. Because the mitochondrial genome is haploid and uniparentaly inherited, it cannot be used to analyse such phenomena. Therefore, a nuclear diagnostic marker is needed and a combined analysis of mitochondrial and nuclear markers should be performed in order to study hybridization between *C. gigas* and *C. angulata* in the populations where the two taxa are now in contact.

CONCLUSION

In this paper, we report the present distribution of the European populations of *Crassostrea gigas* and *Crassostrea angulata*. We show that, in thirty years, *C. gigas* has settled extensively along the European and northern Atlantic coasts. Oyster farming activities created contact zones and consequently hybridization between both taxa might have occurred. The few remaining populations of *C. angulata* are likely to be threatened by the expansion of *C. gigas* in Europe and Northern Africa. Consequently our results highlight the question of whether *C. angulata* should be preserved in Europe. Future studies should be performed to follow the temporal evolution of the two taxa in Europe.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank A Gérard for his support during the course of this work We also thank H McCombie for helping with the text of this manuscript. The authors are indebted to A Manjua for her technical assistance. We thank A Bernoussi, A. Leitao, F Cornette, Ph Goulletquer, T Huet, F. Lango, D. Taghapietra and F. Rivet for providing oyster samples This study was aided financially by the Conseil Général of Charente-Maritime.

REFERENCES

Banks M.A., Hedgecock D. and Waters C., 1993. Discrimination between closely related Pacific oyster species (*Crassostrea*) via mitochondrial DNA sequences coding for large subunit rRNA. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* **2**: 129-136.

Barré D., 1981. Implantation de *Crassostrea gigas* (Thunberg) dans le bassin de Marennes-Oléron. Thèse de Doctorat vétérinaire. Université de Toulouse, 150 p.

Beaubrun P.C., 1976. Les huîtres au Maroc et l'ostréiculture dans la lagune de Oualidia. *Bulletin de l'Institut des Pêches Maritimes du Maroc* **22**: 13-143.

Biocca E. and Matta F., 1982. *Crassostrea angulata* (Lamark, 1819), synonyme de *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793): études morphologiques et génétiques. *Parasitologia* **24**: 211-222.

Boudry P., Heurtebise S., Collet B., Cornette F. and Gerard A., 1998. Genetic differentiation between Portuguese [*Crassostrea angulata* (Lamark)] and Pacific [*Crassostrea gigas* (Thunberg)] oyster populations, as revealed by RFLP analysis of PCR amplified mitochondrial DNA segments. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **226**: 279-291.

Bougrier S., Raguenes G., Bachere E., Tige G. and Grizel H., 1986. Essai de réimplantation de *Crassostrea angulata* en France, résistance au chambrage et comportement des hybrides *C. Angulata C. Gigas*. ICES, Copenhagen (Denmark) ICES. CM. F/38, 10 p.

Buroker N.E., Hershberger W.K. and Chew K.K., 1979. Populations genetics of the family Ostreidae. I. Intraspecific studies of *Crassostrea gigas* and *Saccostrea commercialis*. *Marine Biology* **54**: 157-169.

Butman C.A., 1987. Larval settlement of soft-sediment invertebrates: the spatial scales of patterns explained by active habitat selection and the emerging role of hydrodynamical processes. *Oceanography and Marine Biology: An annual Review* **25**: 113-165.

Cameron R.A., 1986. Introduction to the invertebrate larval biology workshop: a brief background. *Bulletin of Marine Science* **39**: 145-161.

Cochard J.C. and Dardignac M.J., 1977. L'île d'Aix, IV faune. La conchyliculture. *Annales de la Société des Sciences Naturelles de la Charente-Maritime* **6**: 160-165.

Collignon J., 1960. Les huîtres et l'ostréiculture au Maroc. *Bulletin de l'Institut des Pêches Maritimes du Maroc* **4**: 9-17.

Comps M., 1970. Observations relatives à l'infection branchiale des huîtres portugaises (*Crassostrea angulata* Lmk). *Revue de l'Institut des Pêches Maritimes* **33**: 151-160.

Cousteau C., Renaud F. et Delay B., 1991. Genetic characterization of the hybridization between *Mytilus edulis* and *Mytilus galloprovincialis* on the Atlantic coast of France. *Marine Biology* **111**: 87-93.

Daguin C., Bonhomme F. and Borsa P., 2001. Mosaicism in the European zone of sympatry and hybridization of *Mytilus edulis* and *M. galloprovincialis*, as revealed by intron length polymorphism at locus *mac-1*. *Heredity* **86**: 342-354.

Dollfus R.P., 1934. Les huîtres comestibles sur la côte atlantique du Maroc: bancs naturels, perspectives ostréicoles. *Compte rendu de la 58e session de l'Association Française pour l'Avancement des Sciences*, Rabat: 246-248.

FAO, Fisheries Information Data and Statistics Unit (1999). Aquaculture production statistics 1988-1997. FAO Fisheries circular No 815, rev. 11, Rome.

Ferrera P.S and Dias A., 1973 Sur la répartition et l'évolution de l'altération des branchies de *Crassostrea angulata* dans le Tage, le Sado et l'Algarve. ICES, C.M. 1973/K:6.

Folmer O., Black M., Hoech W., Lutz R. and Vrijenhoek R., 1994 DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxydase subunit I from diverse metazoan invertebrates *Molecular Marine Biology and Biotechnology* **3**: 294-299.

Gaffney P.M. and Allen S.K., 1993. Hybridization among *Crassostrea* species: a review *Aquaculture* **116**: 1-13.

Goulletquer P., Wolowicz M., Latala A., Geairon P., Huvet A. and Boudry P., 1999 Comparative analysis of oxygen consumption rates between cupped oyster spat of *Crassostrea gigas* of French, Spanish, Japanese and Taiwanese origins. *Aquatic Living Resources* **12**. 271-277.

Grizel H. and Héral M., 1991 Introduction into France of the Japanese oyster (*Crassostrea gigas*) *Journal du Conseil International de l'Exploration de la Mer* **47**. 399-403.

Héral M., Deslous-Paoli J.M. and Prou J., 1986. Population dynamics and biomass of cultivated cupped oysters (*Crassostrea angulata* and *Crassostrea gigas*) in the Marennes-Oleron Bay on a century. *Conseil International de l'Exploration de la Mer; CM*, F/41, 23 p.

His E., 1972 Premiers éléments de comparaison entre l'huître portugaise et l'huître japonaise Science et Pêche. *Bulletin de l'Institut des Pêches Maritimes* **219:** 1-9.

Pasteur-Humbert C., 1962 Les mollusques marins testacés du Maroc 2 Les Lamellibranches et les Scaphopodes. *Travaux de l'Institut Scientifique Chérifien.*, sér. Zoologie, **28**: 1-184.

Huvet A., Lapègue S., Magoulas A. and Boudry P., 2000. Mitochondrial and nuclear DNA phylogeography of *Crassostrea angulata*, the Portuguese oyster endangered in Europe *Conservation Genetics* **1**: 251-262.

Huvet A., Balabaud K., Bierne N. and Boudry P., 2001 Microsatellite analysis of 6 hour old embryos reveals no preferential intraspecific fertilization between cupped oysters *Crassostrea gigas* and *Crassostrea angulata*. *Marine Biotechnology* **3:** 448-453.

Huvet A., Gérard A., Ledu C., Phélipot P., Heurtebise S. and Boudry P. 2002 Is fertility of hybrids enough to conclude that the two oysters *Crassostrea gigas* and *Crassostrea angulata* are the same species? *Aquatic Living Resources* **15**. 45-52.

Lambert L., Fadeau F. and Blateau R., 1929 *Ostréiculture et Myaliculture sur le littoral centre-ouest*. La Rochelle Imprimerie Jean Foucher 77 p.

Leitão A., Boudry P., Labat J.P. and Thiriot-Quiévreux C., 1999a. Comparative kariological study of cupped oyster species. *Malocologia* **41:** 175-186.

Leitão A., Thiriot-Quiévreux C., Boudry P. and Malheiro I., 1999b. A « G » chromosome banding study of three cupped oyster species. *Crassostrea gigas, Crassostrea angulata* and *Crassostrea virginica* (Mollusca Bivalvia). *Génétique Sélection Evolution* **31**: 519-527.

Lherminer P. and Solignac M., 2000 L'espèce définitions d'auteurs *Comptes rendus de l'Académie des Sciences - Série III - Sciences de la vie* **323**(2): 153-165.

Mathers N.F., Wilkins N.P. and Walne P.R., 1974 Phosphoglucose isomerase and esterase phenotypes in *Crassostrea angulata* and *C. gigas*. *Biochemical Systematics and Ecology* **2**. 93-96.

Mattucci S. and Villani F., 1983. Studio elettroforetico dei sistemi gene enzima in ostriche classificate come *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) e *Crassostrea angulata* (Lamarck, 1819) (Mollusca: Ostreidae). *Parasitologia* **25**: 21-27.

Mayr E., 1963. *Animal Species and Evolution*. Belknap press, Cambridge, MA.

Menzel R.W., 1974. Portuguese and Japanese oysters are the same species *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* **31**: 453-456.

Moore D., 1993 Preparation of genomic DNA from mammalian tissue In *Current Protocols in Molecular Biology* **1**, unit 2-2. 1-2 (F.M. Ausubel, ed.), New York

O'Foighil D., Gaffney P.M., Wilbur A.E and Hilbish T.J., 1998 Mitochondrial cytochrome oxidase I gene sequences support an Asian origin for the Portuguese oyster *Crassostrea angulata*. *Marine Biology* **131**. 497-503

Ranson G., 1948 Prodissoconques et classification des ostréidés vivants *Bulletin du Musee Royal d'Histoire Naturelle de Belgique* **24**. 1-12.

Ranson G., 1960 Les prodissoconques (coquilles larvaires) des ostréidés vivants. *Bulletin de l'Institut Océanographique de Monaco* **1**: 1-41.

Shafee M.S., 1985 Biological adaptation of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*, Thunberg) in a Moroccan lagoon at Oualida. 5th. African Seminar on Aquaculture, Kisumu (Kenya), 7-11 Oct 1985.

Shafee M.S. and Sabatie M.R., 1986. Growth and mortality of Pacific oyster in Oualidia lagoon (Morocco) *Aquaculture* **53**: 201-214

Étude de la synthèse globale de collagène produit par les hémocytes d'un mollusque nacrier, l'ormeau *Haliotis tuberculata.* Mise en évidence d'une variation annuelle

Antoine SERPENTINI [1], Jean-Marc PONCET [1], Eve BOUCAUD CAMOU [1] et Jean-Marc LEBEL [1]

ABSTRACT

Study of the global synthesis of collagen by hemocytes from a nacreous mollusc, the abalone *Haliotis tuberculata*. Evidence for an annual variation.

The study of the collagen total synthesis was performed in primary culture of hemocytes from a nacreous Mollusc, the abalone These *in vitro* studies showed that the total collagen synthesis varied from 15,47 ± 1,3% compared to the total synthesized proteins (in February) to 4,49 ± 1,1% compared to the total synthesized proteins (in June) Moreover, the dosage of the collagen in cell layer (insoluble fraction) and in culture medium (soluble fraction) showed that the ratio soluble collagen/total collagen varied with the season These differences were related with the differents collagen isotypes (and/or relative porportion) synthesized by hemocytes during the year.

RÉSUMÉ

L'étude de la synthèse globale de collagène dans les hémocytes d'un Mollusque nacrier l'ormeau en culture primaire a été entreprise. Les études *in vitro* nous ont permis de montrer que la synthèse globale de collagène varie de 15,47 + 1,3% des protéines totales synthétisées (en Février) à 4,49 + 1,1% des protéines totales synthétisées (en Juin) De plus, le dosage du collagène dans le tapis cellulaire (fraction insoluble) d'une part, et le milieu de culture (fraction soluble) d'autre part, montre que le rapport collagène soluble/collagène total varie lui aussi en fonction de la saison. Ces différences sont à mettre en relation avec les différents isotypes collagéniques (et/ou leur proportions relatives) synthétisés par les hémocytes, au cours de l'année.

[1] Laboratoire de Biologie et Biotechnologies Marines – IBBA Université de Caen – Esplanade de la Paix F 14032 Caen cedex, France.

INTRODUCTION

L'utilisation de systèmes *in vitro* de cultures primaires, ont permis la mise en place de nouvelles approches afin d'analyser la synthèse de la matrice extracellulaire (MEC) et la régulation de cette synthèse, chez les Vertébrés et les Invertébrés. Les hémocytes d'Invertébrés constituent une population hétérogène d'un point de vue morphologique et fonctionnel. Parmi leurs diverses fonctions, les mécanismes de défense immunitaire constituent leur rôle majeur (Pipe *et al.*, 1997). Cependant, au cours du développement embryonnaire, les hémocytes contribuent aussi à la formation de la membrane basale chez les insectes (Ball *et al.*, 1987) notamment en synthétisant du collagène (Knibiehler *et al.*, 1987). Les hémocytes sont également impliqués dans les processus de réparation *via* la synthèse des composés de la MEC (Wagge, 1951; Suzuki *et al.*, 1991). Prenant en compte ces caractéristiques, il semble que les hémocytes en culture primaire soient un modèle adéquat pour étudier *in vitro* la synthèse de collagène.

Chez les Vertébrés, 20 isotypes collagéniques codés par au moins 33 gènes différents ont été décrits à ce jour. Dans les modèles de cultures cellulaires, certains collagènes peuvent être dosés dans la fraction correspondant au tapis cellulaire (collagènes insolubles) ou dans le milieu de culture (collagènes solubles). Il a été démontré que les fractions solubles et insolubles peuvent représenter des isotypes collagéniques différents. A titre d'exemple, les collagènes d'origines fibroblastiques (cellules connues pour synthétiser majoritairement du collagène de type I) se retrouvent à environ 90% dans le milieu de culture et à 10% dans le tapis cellulaire (Kruse *et al.*, 1978). Au contraire, les collagènes d'origines chondrocytaires (cellules connues pour synthétiser majoritairement du collagène de type II) se retrouvent à environ 80% dans le tapis cellulaire et à 20% dans le milieu de culture (Galéra *et al.*, 1992). Ainsi dans notre modèle, les dosages dans le tapis cellulaire et dans le milieu de culture peuvent permettre de différencier la synthèse de collagènes solubles et de collagènes insolubles, et donc d'apporter des informations sur le type de collagène synthétisé par les hémocytes.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les cultures primaires

Les hémocytes sont mis en culture selon la méthode utilisée par Lebel *et al.* (1996) et Serpentini *et al.* (2000). Les ormeaux (taille 8 10 cm) subissent une incision médiolatérale au niveau du pied, l'hémolymphe est alors collectée puis diluée dans un rapport 1:3 dans une solution d'Alsever (115 mM glucose, 27 mM sodium citrate, 12 mM EDTA, 380 mM NaCl). Après comptage à l'aide d'une cellule de Mallassez, 350 000 cellules/cm^2 sont ensemencées dans des plaques de culture 6 puits. Trois volumes d'eau de mer synthétique sont ajoutés. Ainsi, après 1h30 d'incubation à 15°C, la totalité des cellules a adhéré au support et le surnageant est éliminé puis remplacé par 1,2 ml de milieu de Hank's 199 dont l'osmolarité est ajustée à 1000 mOsm avec 250 mM de NaCl, 10 mM de KCl, 25 mM de $MgSO_4$, 2,5 mM de $CaCl_2$, 10 mM d'Hepes, pH 7,4 et additionné de 2 mM de L-glutamine et 2 mM de concanavaline A. Le milieu est supplémenté en antibiotiques par 60 mg/l de pénicilline et 100 mg/l de streptomycine.

Dosage de la synthèse globale de collagène

La méthode utilisée est adaptée du dosage mis au point par Peterkosky et Diegelmann (1971) et modifiée par Galéra (1992). A chaque puits sont ajoutés 200 µM de β-aminopropionitrile, afin d'empêcher la formation de liaisons croisées entre les collagènes néosynthétisés, par inhibition des lysyl oxydases (Narayanan *et al.*, 1972), 300 µM d'acide ascorbique, cofacteur indispensable pour l'hydroxylation de la proline et 1 µCi/m. de L (2,3,4,5-^{3}H) proline (Activité spécifique: 75µCi/mmol).

Après 40 heures d'incubation à 15°C, le milieu est prélevé et transféré dans un microtube, le tapis cellulaire est rincé avec de l'eau de mer synthétique afin d'éliminer la radioactivité non incorporée et les cellules sont grattées dans 1 ml de Tris (50 mM)-$CaCl_2$ (10 mM) pH: 7,6, puis déposées dans un microtube.

Le contenu de chaque microtube est alors passé aux ultrasons (20 sec, 50% de la puissance maximale) et homogénéisé, pour être séparé en deux fractions égales: l'une d'elle reçoit 50 U/ml de collagénase bactérienne de *Clostridium histolyticum* (collagénase hautement purifiée, libre de toute activité enzymatique non spécifique), l'autre reçoit un volume égal de tampon ayant servi à reprendre la collagénase. Les tubes sont incubés 17 h puis refroidis 10 min à 4°C.

Chaque échantillon reçoit 90 µl d'une solution d'albumine sérique bovine (BSA) à 1 µg/µl, qui joue le rôle d'entraîneur puis 160 µl d'une solution [TCA 25% acide tannique 1,25%] sont ajoutés afin de précipiter les protéines. Les tubes sont placés 10 min dans la glace, puis centrifugés (5000 g, 10 min, 4°C) et le surnageant est éliminé. Le culot est alors resuspendu dans 1 ml de [TCA 10%-acide tannique 0,5%], puis centrifugé (5000 g, 10 min). Cette dernière opération est répétée deux fois afin d'éliminer la proline marquée libre du culot protéique. Ce dernier est enfin dissous dans 250 µl d'hydroxyde de sodium (NaOH) 1 M. Deux cents µl de chaque échantillon sont déposés dans des fioles de comptage contenant 200 µl d'acide chlorhydrique (HCl) 1M afin de neutraliser le pH. Quatre ml de liquide à scintillation sont ajoutés à chaque tube et la radioactivité est mesurée en unité dpm.

La quantité de protéines collagéniques radioactives (PC) est estimée par différence entre la valeur obtenue dans les tubes témoins (protéines totales: PT) et celle des tubes traités par la collagénase (protéines non collagéniques: PNC). La proportion de collagène par rapport aux autres protéines peut être alors calculée d'après la formule suivante, qui tient compte de la teneur élevée en proline du collagène par rapport aux autres protéines (Diegelmann et Peterkofsky, 1972):

$$\% \text{ collagène} = \text{dpm (CP)}/[\text{dpm (CP)} + 5{,}4 \text{ dpm (NCP)}].$$

RÉSULTATS

Les expérimentations ont été réalisées à partir d'hémocytes prélevés sur des ormeaux à deux périodes différentes de l'année. Une première série d'études a été effectuée en hiver (Février) et une deuxième série concerne des animaux prélevés au printemps été (Juin). Afin de quantifier la synthèse globale de collagène, les hémocytes en culture primaire sont incubés en présence de proline tritiée pendant 40 heures après l'adhésion des cellules. La présence de

protéines sensibles à la collagénase bactérienne est recherchée dans les fractions tapis cellulaire et milieu de culture.

Pour les dosages réalisés en Février, la synthèse globale de collagène par les hémocytes en culture primaire représente 15,47 ± 1,3% par rapport aux protéines totales (Figure 1). Le tableau 1 présente les résultats obtenus en ce qui concerne la distribution de ces collagènes au niveau du milieu de culture et du tapis cellulaire. Les 15,47% de synthèse global se répartissent en 14,09 ± 1,1% dans le tapis cellulaire (collagène insoluble) et 1,38 ± 0,2% dans le milieu de culture (collagène soluble).

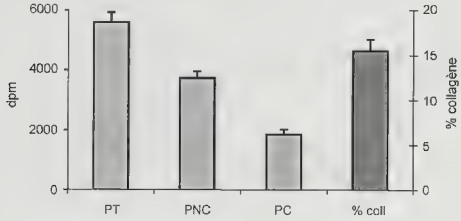


Figure 1 Dosage de la synthèse globale de collagène à partir d'hémocytes en culture primaire prélevés au mois de Février. Le dosage est réalisé en digérant les échantillons à 37°C pendant 17 heures avec 50 U/ml de collagénase. Les résultats sont exprimés en % de collagène synthétisé par rapport aux protéines totales. PT: protéines totales, PNC: protéines non collagéniques, PC: protéines collagéniques, % coll: pourcentage de collagène synthétisé.

Tableau 1. Tableau récapitulatif de la néosynthèse des collagènes par les hémocytes de l'ormeau *Haliotis tuberculata* en fonction de la période de prélèvement des cellules. La synthèse de collagène est calculée suivant la relation mathématique de Peterkofsky et Diegelmann (1971) comme décrit dans le matériel et méthodes.

Période de l'année	Synthèse globale de collagène (en % des protéines totales)	Distribution des collagènes néosynthétisés (en % des protéines totales)		Répartition des collagènes néosynthétisés (en %)	
		tapis cellulaire	milieu	insolubles	solubles
Février	15,47%	14,09	1,38	91,08	8,92
Juin	4,48%	1,25	3,24	27,84	72,16

La Figure 2 représente la synthèse globale de collagène par des hémocytes prélevés en Juin. Cette synthèse est de 4,48 ± 1,1% par rapport aux protéines totales. Le tableau 1 indique que les 4,48% de collagène synthétisé se répartissent en 1,25 ± 0,4% dans le tapis cellulaire (collagène insoluble) et 3,24 ± 0,7% dans le milieu de culture (collagène soluble).

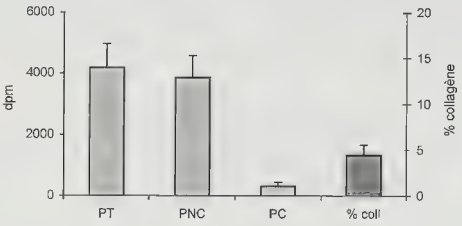


Figure 2. Dosage de la synthèse globale de collagène à partir d'hémocytes en culture primaire prélevés au mois de Juin. Le dosage est réalisé en digérant les échantillons à 37°C pendant 17 heures avec 50 U/ml de collagénase. Les résultats sont exprimés en % de collagène synthétisé par rapport aux protéines totales. PT: protéines totales, PNC: protéines non collagéniques, PC: protéines collagéniques, % coll: pourcentage de collagène synthétisé.

Ainsi, en Février, les collagènes insolubles représentent la grande majorité des collagènes synthétisés (91,08 ± 6,8%, tableau 1), alors qu'en Juin ce sont les collagènes solubles qui représentent la majeur partie des collagènes synthétisés (72,16 ± 14,9%, tableau 1).

DISCUSSION

Le dosage de la synthèse globale de collagène est basé sur la méthode mise au point par Peterkofsky et Diegelmann (1971) et revue par Peterkofsky et collaborateurs (1982). Nous avons mis en évidence une néo-synthèse globale de collagène *in vitro* dans des cultures primaires d'hémocytes d'ormeau, *Haliotis tuberculata*. Celle-ci varie en fonction de la saison entre 4,49% par rapport aux protéines totales (en Juin) et 15,47% par rapport aux protéines totales (en Février). A titre comparatif, la synthèse globale de collagène mesurée pour les cellules de Vertébrés varie de 2 à 5% des protéines totales pour des chondrocytes humains (Schwartz *et al.*, 1995), représente 15% des protéines totales pour des cellules osseuses humaines (Beresford *et al.*, 1986) et 16% des protéines totales pour des fibroblastes de souris (Kruse *et al.*, 1978). Il est intéressant de comparer les résultats de notre travail avec la seule étude réalisée chez un Invertébré. Ainsi, la synthèse globale de collagène a été analysée dans des micromères d'oursin (Benson *et al.*, 1990). Cette synthèse varie de 0,5% à 5% par rapport aux protéines totales durant les cinq premiers jours de culture. Ainsi, la synthèse *de novo* observée sur les hémocytes en culture primaire est comparable à celle observée pour d'autres modèles.

Au cours de cette étude, nous avons pu mettre en évidence une différence marquée de la synthèse de collagène entre les hémocytes prélevés en Juin ou en Février. Cette différence étant d'un facteur 3,45. Ces résultats sont en accord avec ceux publiés récemment par Yoneda et collaborateurs (2000). Dans ce dernier travail, ces auteurs ont dosé le collagène à partir du muscle du pied de l'ormeau *Haliotis discus,* et cela, par une approche basée sur des techniques d'extraction. Yoneda et collaborateurs ont pu observer une variation saisonnière de la quantité de collagène musculaire. Celle ci varie d'environ 12% du poids sec en Février à 4% du poids sec en Juillet. Ainsi, nos résultats obtenus *in vitro* (culture de cellules) pour des hémocytes sont en très bon accord avec ceux obtenus par Yoneda et collaborateurs (2000) après extraction du collagène à partir du muscle du pied.

Par ailleurs, le dosage du collagène a été effectué séparément, d'une part dans le tapis cellulaire et d'autre part dans le milieu de culture. Le collagène retrouvé dans la fraction 'milieu de culture' correspond au collagène soluble. Chez les Invertébrés, Benson et collaborateurs (1990) ont montré que, dans le cas des micromères d'oursin en culture primaire, 90% des collagènes synthétisés sont sécrétés dans le milieu de culture. Dans notre étude, entre 8,92% (Février) et 72,16% (Juin) des collagènes synthétisés par les hémocytes sont localisés dans le milieu de culture et correspondent donc à du collagène soluble. Par référence aux Vertébrés supérieurs, les collagènes solubles sont composés des collagènes de types I, III et V. Ainsi, il est probable que l'un des collagènes solubles synthétisé par les hémocytes puisse correspondre à un collagène de type I de Vertébrés. La présence de collagène de type *I-like* a été mise en évidence grâce à différentes méthodologies dans les hémocytes d'ormeau (Serpentini *et al*, 2000). D'autre part, un collagène fibrillaire correspondant a un collagène de type I de Vertébrés a été dernièrement caractérisé dans le muscle de l'ormeau *Haliotis discus* (Yoneda *et al*, 1999) montrant que les cellules de Mollusques ont la capacité de synthétiser un tel collagène.

Par ailleurs, nous avons montré que les hémocytes synthétisent des collagènes insolubles que l'on dose dans la fraction 'tapis cellulaire'. Ceux ci représentent entre 91,08% et 27,84% de la totalité des collagènes synthétisés. Le collagène non fibrillaire de type IV appartient aux collagènes insolubles. La présence de cet isotype collagénique est suggérée par des études en *northern blotting* réalisées à partir d'hémocytes de l'ormeau (Serpentini *et al.*, 2000). Par ailleurs, l'étude d'un ADNc issu des hémocytes de drosophile a montré que ces cellules synthétisent un collagène de type IV (Cecchini *et al.*, 1987).

Ainsi, la synthèse globale de collagène à partir d'hémocytes de l'ormeau *Haliotis tuberculata* varie au cours de l'année Cette synthèse est plus importante en hiver par rapport à la période printemps-été. Par ailleurs, nous avons montré que la distribution des collagènes synthétisés (fractions soluble et insoluble) varie également au cours de ces deux périodes. Les fractions solubles et insolubles représentent des isotypes collagéniques différents. Ainsi, il serait intéressant de mettre en relation cette saisonnalité de la synthèse de collagène avec la physiologie des hémocytes. Les hémocytes jouent un rôle majeur dans les processus de construction et de régénération de nombreux tissus *via* le dépôt des composants de la MEC (Kriger *et al.*, 2001). Chez l' ormeau, une relation entre le métabolisme du collagène et le développement des gonades a été envisagée par Webber (1970) La période de Février-Mars est marquée par la restructuration des gonades et la reprise des activités gonadiques chez *Haliotis tuberculata* (Belhsen, 2000). Dans notre étude, la synthèse élevée de collagène en Février correspond, en grande partie, au collagène

insoluble. Le collagène de type IV, constituant majeur de la lame basale, appartient à cette catégorie collagènique. Sachant que les hémocytes sont impliqués dans la formation de la lame basale chez les insectes (Ball *et al.*, 1987) *via* la sécrétion de collagène (Knibiehler *et al.*, 1987), l'importante synthèse hémocytaire de collagène insoluble observée en Février pourrait être mise en relation avec la restructuration et la ré-initiation des activités gonadiques qui se déroulent en Février-Mars chez *Haliotis tuberculata*. Une analyse du devenir des différents types de collagènes synthétisés par les hémocytes pourrait apporter des informations importantes sur les rôles des cellules hémocytaires.

BIBLIOGRAPHIE

Ball E.E., Gert de Couet H., Horn P.L. & Quinn J.M.A., 1987. Haemocytes secrete basement membrane components in embryonic locusts. *Development* **99**: 255-259.

Belhsen O.K., 2000. Etude cytologique de la gamétogenèse, du système nerveux central et du cycle de reproduction de l'ormeau européen *Haliotis tuberculata* (L.). *Thèse de Doctorat de l'Université de Caen*, 246 p.

Benson S., Smith L., Wilt F. & Shaw R., 1990. The synthesis and secretion of collagen by cultured sea urchin micromeres. *Experimental Cell Research* **188**: 141-146.

Beresford J.N., Gallagher J.A. & Russel R.G.G., 1986. 1,25-dihydroxyvitamin D_3 and human bone derived cells *in vitro*: effects on alkaline phosphatase, type I collagen and proliferation. *Endocrinology* **119**(4): 1776-1785.

Cecchini J.-P., Knibiehler B., Mirre C. & Le Parco Y., 1987. Evidence for a type-IV related collagen in *Drosophila melanogaster*. Evolutionary constancy of the carboxyl-terminal noncollagenous domain. *European Journal of Biochemistry* **165**: 587-593.

Diegelmann R.F. & Peterkofsky B., 1972. Collagen biosynthesis during connective tissue development in chick embryo. *Developmental Biology* **28**: 443-453.

Galéra P., Rédini F., Vivien D., Bonaventure J., Penfornis H., Loyau G. & Pujol J.-P., 1992. Effect of transforming growth factor-β1 (TGF β1) on matrix synthesis by monolayer cultures of rabbit articular chondrocytes during the dedifferentiation process. *Experimental Cell Research* **200**: 379-392.

Knibiehler B., Mirre C., Cecchini J.-P. & Le Parco Y., 1987. Haemocytes accumulate collagen transcripts during *Drosophila melanogaster* metamorphosis. *Roux's Archives of Developmental Biology* **196**: 243-247.

Kriger J.A., Natzle J.E. & Green M.M., 2001. Hemocytes are essential for wing maturation in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Science, U.S.A.* **98**(18):10190-10195.

Kruse N.J., Rowe D.W., Fujimoto W.Y. & Bornstein P., 1978. Inhibitory effects of glucocorticoids on collagen synthesis by mouse sponge granulomas and granuloma fibroblasts in culture. *Biochimica et Biophysica Acta* **540**: 101-116.

Lebel J.M., Gtard W., Favrel P. & Boucaud-Camou E., 1996. Effects of different vertebrate growth factors on primary cultures of hemocytes from the gastropod mollusc, *Haliotis tuberculata*. *Biology of the Cell* **86**: 67-72.

Narayanan A.S., Siegel R.C. & Martin G.R., 1972. On the inhibition of lysyl oxidase by β-aminopropionitrile. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **46**: 745-751.

Peterkofsky B., Choiher M & Bateman J., 1982 Determination of collagen synthesis in tissue and cell culture systems. *In* Immunochemistry of the extracellular matrix (Furthmayr H, ed.): 19-47. CRC Press, Boca Raton.

Peterkofsky B & Diegelmann R, 1971. Use of a mixture of proteinase free collagenases for the specific assay of radioactive collagen in the presence of other proteins. *Biochemistry* **10**(6): 988-993

Pipe R.K., Farley S.R., Coles J.A., 1997. The separation and characterisation of haemocytes from the mussel *Mytilus edulis*. *Cell and Tissue Research* **289**: 537-545.

Schwartz Z, Dean D. D., Walton J K., Brooks B P. & Boyan B D, 1995 Treatment of resting zone chondrocytes with 24,25-dihydroxyvitamin D_3 [24,25-$(OH)_2D_3$-responsive phenotype characteristic of growth zone chondrocytes. *Endocrinology* **136**(2): 402-411

Serpentini A, Ghayor C, Poncet J.-M, Hebert V., Galéra P, Pujol J -P., Boucaud-Camou E & Lebel J M, 2000. Collagen study and regulation of the *de novo* synthesis by IGF-I in hemocytes from the gastropod mollusc, *Haliotis tuberculata*. *Journal of Experimental Zoology* **287**. 275-284.

Suzuki T, Yoshinaka R, Mizuta S, Funakoshi S& Wada K., 1991 Extracellular matrix formation by amebocytes during epithelial regeneration in the pearl oyster *Pinctada fucata*. *Cell and Tissue Research* **266** 75-82.

Wagge L.E., 1951. The activity of amoebocytes and of alkaline phosphatases during the regeneration of the shell in the snail, *Helix aspersa*. *Quarterly Journal of Microscopical Science* **92**(3): 307-321

Webber H H, 1970. Changes in metabolite composition during the reproductive cycle of the abalone *Haliotis cracherodii* (Gastropoda Prosobranchiata). *Physiological Zoology* **43**: 213-231

Yoneda C., Hirayama Y., Nakaya M., Matsubara Y, Irie S., Hatae K. & Watabe S, 1999. The occurrence of two types of collagen proα-chain in the abalone *Haliotis discus* muscle. *European Journal of Biochemistry* **261**: 714-721.

Yoneda C, Ahsan M N, Nakaya M, Matsubara Y., Ebihara T, Irie S, Uno Y., Hatae K & Watabe S, 2000 Abalone collagens. immunological properties and seasonal changes of their mRNA levels *Comparative Biochemistry and Physiology B* **126**: 59-68.

The food quality of *Tetraselmis suecica* slurry for *Crassostrea gigas* spat

René ROBERT [1], Giuliana PARISI [2], Roberta PASTORELLI [3], Bianca Maria POLI [2] and Mario TREDICI [3]*

ABSTRACT

In an attempt to provide cost-effective alternatives to live microalgae and to simplify hatchery-nursery procedures, concentrated microalgae appear to be very promising. Due to its high preservation ability, Prasinophytes appear to be good candidates for such alternative diets. Nevertheless, in a previous study the utilization of *Tetraselmis suecica* was only conceivable for old *Crassostrea gigas* larvae. In the present work its nutritional quality has been accordingly searched on Japanese oyster's juveniles. Whatever the assemblages and condition, fresh or preserved microalgae, *T. suecica* did not allow an adequate postlarval development in *C. gigas*.

RÉSUMÉ

Valeur alimentaire du concentré de *Tetraselmis suecica* pour les post-larves de *Crassostrea gigas*

L'utilisation de microalgues concentrées et conservées est une des voies envisagées pour améliorer les procédures en écloserie-nurserie de mollusques et en diminuer les coûts de production. Comme elles présentent de bonnes aptitudes à la conservation, les Prasinophycées s'avèrent de bons candidats potentiels. Au cours d'une précédente étude il a été démontré que l'utilisation de *Tetraselmis suecica* n'était envisageable que chez des larves âgées de *Crassostrea gigas*. Dans le présent travail, la valeur alimentaire de cette algue fraîche et conservée a donc été recherchée sur des juvéniles de l'huître japonaise. Quel que soit l'assemblage considéré et quelle que soit sa forme, fraîche ou conservée, *T. suecica* ne permet pas un développement postlarvaire satisfaisant chez *C. gigas*.

[1] Laboratoire de Physiologie des Invertébrés Marins, Station Expérimentale d'Argenton, IFREMER, Presqu'île du Vivier, 29840 Landunvez, France. email <rrobert@ifremer.fr>. (* *Corresponding author*)
[2] Dipartimento di Scienze zootecniche, Via delle Cascine 5, 50144 Firenze, Italia.
[3] Dipartimento di Scienze e Tecnologie Alimentari e Microbiologiche, Piazzale delle Cascine 27, 50144 Firenze, Italia

INTRODUCTION

In an attempt to provide cost-effective alternatives to live microalgae and to simplify hatchery-nursery procedures, substitution products have been tested over the past few years (for reviews see Robert and Trintignac, 1997; Knauer and Southgate, 1999) but resulted generally in lower growth and higher mortalities than those recorded for control fed live microalgae. However, concentrated microalgae (slurry or paste) appear to be the most promising alternative product (Nell and O'Connor, 1991; Robert and Trintignac, 1997; McCausland *et al.*, 1999) but the limiting factor for developing this technique for aquaculture feeds is the preservation method which should maintain unaltered the nutritional properties (food value) that characterize "living" algae. It has been shown that the Prasinophyceae *Tetraselmis suecica* might be preserved at low positive temperature (4° C), without apparent cells viability alteration (Tredici *et al.*, 1996) and with stability of its biochemical composition, such as fatty acid profiles (Montani *et al.*, 1995). The food value of *T. suecica* as fresh microalgae (on site production) and slurry (remote production) have been recently investigated for *Crassostrea gigas* larvae (Robert *et al.*, 2001) The size of this microalgae limits its use by larvae but its potential for spat has to be considered The present work reports its effects as preserved microalgae (remote production) on *C. gigas* postlarval development.

MATERIALS AND METHODS

T. suecica (strain Orbetello) was produced in Florence in 40L alveolar plate reactors following methods already described (Tredici *et al.*, 1996). The biomass was harvested by centrifugation and transported as concentrated slurry to Brest at 4°C, resuspended in fresh medium at a concentration of 23.10^6 cells mL^{-1} and kept refrigerated in the dark. The other microalgae were grown at Brest in 300 L batch cultures. Juvenile *Crassostrea gigas* (≈ 1 to 1.5 mm) were obtained from a commercial hatchery (SATMAR, Normandie, France). Oysters were divided into 18 groups of similar weight (≈ 5 g wet weight) and placed into rectangular PVC chambers (51 mm length x 51 mm width x 25 mm depth) with a 400 µm nylon mesh base. Each chamber was suspended 10 mm from the base of a tub filled with 26 L seawater. Seawater (34-35 ppm, 17.5° C) was constantly dripped into the top of each chamber at a flow rate of 700 mL.min^{-1} (downweller system). A total ration of 5.10^4 phytoplancton cells.mL^{-1} (final concentration after dilution with the seawater) was also delivered continuously into each chamber. Duplicate chambers were assigned to each of nine dietary treatments The following diets, with a similar amount of food in term of volume, were used: no additional microalgae (no food); fresh *T. suecica* (Tetra) ; preserved slurry of *T. suecica* (Slurry) ; *Isochrysis aff galbana* (T. Iso) ; *Chaetoceros calcitrans* (Chaeto) ; *Isochrysis aff. galbana* + preserved *T. suecica* (T. Iso + Slurry) ; *Chaetoceros calcitrans* + preserved *T. suecica* (Chaeto + Slurry) ; *Isochrysis aff. galbana* + *Chaetoceros calcitrans* (T. Iso + Chaeto) ; *Isochrysis aff. galbana* + *Chaetoceros calcitrans* + preserved *T. suecica.* (T. Iso + Chaeto + Slurry). On day 21, growth estimates were based on measurements, from each treatment replicate, of oyster length and dry weight (100 and 200 individuals oyster respectively) on day 21.

RESULTS

The growth of *C. gigas* spat fed on different diets is shown in Figure 1. One way ANOVA confirmed the highly significant effect of diet on postlarval length ($F = 173$, $p < 0.001$) and dry weight ($F = 216$; $p < 0.001$). Scheffés' multiple comparison tests showed significant differences between most of the diets except between both *T. suecica* conditioning (fresh microalgae or slurry) and, for dry weight only, between the ternary diet (T. Iso + Chaeto + Slurry) and the unialgal diets Chaeto and T. Iso. No growth in length or weight was noted for unfed spat, while those fed

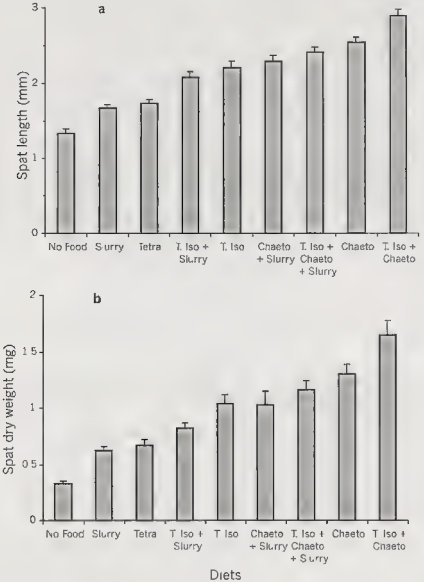


Fig. 1. Effect of different diets on *C. gigas* spat length (A) and dry weight (B) after 3 weeks of rearing (mean values ± 95% confidence intervals).

unialgal diets showed the lowest growth rate except those fed *C. calatrans*. The binary diet (T.Iso + Chaeto) led to the highest length and weight increments (71 5 µm.d^{-1} and 0 065 mg.d^{-1}). The addition of preserved *T. suecica* to any diet depressed the growth while spat fed with fresh or preserved *T. suecica* showed similar development (18 5 µm.d^{-1} and 0 018 mg. d^{-1} *vs* 16.0 µm. d^{-1} and 0.016 mg. d^{-1} respectively).

DISCUSSION AND CONCLUSION

Unfed spat showed no significant growth confirming the effectiveness of the seawater filtration system and providing confidence that growth on experimental algal diets was not supplemented measurably by natural seston. Whatever the diets, addition of preserved *T. suecica* depressed growth. Therefore it has been shown that the food quality of *T. suecica* slurry did not change apparently during the first month of storage (Robert *et al.*, 2001). Moreover, when fed as unialgal diets with fresh *T. suecica* or slurry, oyster spat exhibited similar development. This indicates that the preservation process is not the cause of such depression but the species itself which seems to be poorly assimilated by *C. gigas* spat. The size or weight depression corresponds accordingly to a lack of good food compared to the other more well balanced diets.

T. suecica is of poor food value for *C. gigas* spat. Because it has been already shown that due to its size its use was limiting for the Japanese oyster larvae, this Prasinophyceae is accordingly of low interest for *C. gigas* rearing.

AKNOWLEDGMENTS

This work was partially supported by a grant through a GALILEO project.

REFERENCES

Knauer, J. & Southgate P.C., 1999. A review of the nutritional requirements of bivalves and the development of alternative and artificial diets for bivalve aquaculture. *Reviews in Fisheries Science* **7**(3-4): 241-280.

McCausland M.A., Brown M., Barret S.M., Diemar J.A. & Heasman M.P., 1999. Evaluation of live microalgae and microalgal pastes as supplementary food for juvenile Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture* **174**: 323-342.

Montani E., Chini Zitelli G., Tredici M.R., Molina Grima E., Fernández Sevilla J.M. & Sánchez Pérez J.A., 1995. Long term preservation of *Tetraselmis suecica*: influence of storage on viability and fatty acid profile. *Aquaculture* **134**: 81-90.

Nell J.A. & O'Connor W.A., 1991. The evaluation of fresh algae and stored algal concentrates as a food source for Sydney rock oyster, *Saccostrea commercialis*, larvae. *Aquaculture* **99**: 277-284.

Robert R. & Trintignac P., 1997. Substitutes for live microalgae in mariculture. *Aquatic Living Resources* **10**, 315-327.

Robert R., Parisi G., Rodolfi L., Poli B.M. & Tredici M.R., 2001. Use of fresh and preserved *Tetraselmis suecica* for feeding *Crassostrea gigas* larvae. *Aquaculture* **192**: 333-346.

Tredici M.R., Chini Zitelli G. & Montani E., 1996. Cold preservation of microalgae aquaculture feeds. Refrigeration and Aquaculture proceedings, Bordeaux France, 20-22 March 1996, 25-32.

Valeur alimentaire de *Tetraselmis striata* et *T. chui* pour les larves de *Crassostrea gigas*

*Emanuele PONIS [1], Giuliana PARISI [1] et René ROBERT [2]**

ABSTRACT

Food value of *Tetraselmis striata* and *T. chui* for *Crassostrea gigas* larvae

In an attempt to simplify mollusc hatchery-nursery procedures and to provide cost-effective alternative diets, the use of concentrated and preserved microalgae is an alternative to the use of fresh microalgae. Because of their ability for preservation, Prasinophytes appears to be good candidates for remote algal production. In the present work, the food value of fresh and preserved *Tetraselmis chui* and *T. striata* for umboned *Crassostrea gigas* larvae was studied. During the first experiment, fresh *T. striata* led to the best larval development, but these performances were not confirmed subsequently. When used as monospecific diets the food value of both Prasinophytes is unsufficient to support a good *C. gigas* larval development. However in bispecific diets a substitution of 50% of fresh *Chaetoceros calcitrans* forma *pumilum* with the preserved *T. striata* concentrates did not influence neither growth nor survival rate of *C. gigas* larvae.

RÉSUMÉ

L'utilisation de microalgues concentrées et conservées est une des voies envisagées pour améliorer les procédures en écloserie-nurserie de mollusques et en diminuer les coûts de production. Car elles présentent de bonnes aptitudes à la conservation, les Prasinophycées s'avèrent de bons candidats potentiels. Dans le présent travail, la valeur alimentaire de *Tetraselmis chui* et *T. striata*, en tant qu'algue fraîche ou conservée, a été recherchée sur des larves umbonées de *Crassostrea gigas*. Au cours d'une première expérience, *T. striata* s'est avérée être la microalgue autorisant le meilleur développement larvaire, mais ces résultats n'ont pu être reproduits ultérieurement tant sur l'algue fraîche que conservée. Utilisées comme seule source nutritionnelle, *T. chui* et *T. striata* ne présentent pas une qualité alimentaire suffisante pour autoriser une bonne croissance des larves d'huître japonaise. Cependant, l'utilisation de *T. striata*, sous sa forme concentrée et conservée, a permis de substituer, en régime bispécifique, 50% d'une microalgue de très bonne valeur nutritionnelle comme *Chaetoceros calcitrans* forma *pumilum* sans influencer négativement les performances de développement larvaire.

[1] Dipartimento di Scienze Zootecniche, Università di Firenze, Via delle Cascine 5, 50144 Florence, Italie

[2] Laboratoire de Physiologie des Invertébrés Marins, Station Expérimentale d'Argenton, IFREMER, Presqu'île du Vivier, 29840 Landunvez, France. email <rrobert@ifremer.fr> (* *Correspondant*)

INTRODUCTION

Les microalgues vivantes sont traditionnellement utilisées en écloserie-nurserie pour servir d'alimentation aux mollusques bivalves (Brown *et al.*, 1997; Robert et Trintignac, 1997). Ceci nécessite une synchronisation rigoureuse des productions primaire et secondaire. De plus, afin de pallier à un déficit de phytoplancton, ces productions sont souvent excédentaires. Or, le coût de production par les méthodes conventionnelles est élevé puisqu'il représente 20 à 50% du coût de fonctionnement d'une écloserie (Beneman, 1992; Coutteau et Sorgeloos, 1992) Ces inconvénients pourraient être levés si des techniques d'alimentation différée par concentration et conservation de la biomasse étaient développées. Des travaux ont été engagés dans ce sens dans notre laboratoire et nous avons ainsi pu montrer l'efficacité de cette approche avec *Tetraselmis suecica*. Cependant cette microalgue, utilisée en régime monospécifique, sous sa forme fraîche ou conservée, s'est avérée de faible valeur nutritionnelle tant pour les larves que les post larves de *Crassostrea gigas* (Robert *et al*, 2000; Robert *et al.*, 2001). À l'inverse, de bonnes croissances ont été rapportées chez des juvéniles de *C. virginica* alimentées avec deux autres Prasinophycées, *T. striata* et *T. chui* (Wikfors *et al.*, 1996). Compte tenu de l'aptitude des Prasinophycées à la conservation à basse température positive (Tredici *et al.*, 1996), la qualité alimentaire de ces deux espèces de *Tetraselmis* a donc été recherchée sur les larves d'huître japonaise.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Pavlova lutheri et *Chaetoceros calcitrans* forma *pumilum*, utilisées dans nos expériences comme témoins nutritionnels, étaient originaires du souchier de l'écloserie d'Argenton tandis que *Tetraselmis chui* et *T. striata* provenaient du laboratoire de Milford (USA). Produites en ballons de 2L et 6L sur milieu de Conway (Walne, 1966) à la température de 20°C sous éclairement continu (160 µmoles photons m^{-2} s^{-1}) et avec apport permanent d'air et CO_2 (2% du mélange), elles étaient utilisées en fin de phase exponentielle.

Compte tenu de leur grande taille relative (diamètre moyen équivalent = 7,0 - 8,5 µm), *T. chui* et *T. striata* n'ont pu être apportées aux larves qu'à partir du stade umboné. Des jeunes larves de *C. gigas* ont donc été préalablement élevées en cuve cylindro-conique de 200L pendant 10 à 14 jours selon des techniques décrites par ailleurs (Robert et Gérard, 1999). Après leur sélection sur un tamis de maille de 80 µm, les larves umbonées (taille initiale 140 150 µm) ont été réparties dans des béchers en verre de 2L, à raison de 5 individus.ml^{-1}, en eau de mer filtrée à 1µm, maintenue à 25°C, à salinité ambiante (34-35 ppm) et soumises à différents régimes.

Deux séries expérimentales ont été réalisées. La première, conduite avec des seules microalgues fraîches, avait pour but d'identifier, entre *T. chui* et *T. striata*, la Prasinophycée la mieux adaptée au développement larvaire de *C. gigas*, tandis que la deuxième consistait à définir la valeur alimentaire de l'algue sélectionnée sous sa forme conservée. Dans un premier temps, cinq conditions nutritionnelles étaient appliquées: régimes monospécifiques – *P. lutheri* (P), *T. chui* (Tc), *T. striata* (Ts); régimes bispécifiques – PTc, PTs. Dans un second temps, les larves recevaient les régimes alimentaires suivants: monospécifiques = *P. lutheri* (P), *C. calcitrans* forma *pumilum* (Cp), *T. striata* sous sa forme fraîche (Ts) et conservée pendant 3 semaines à 4°C (Tsc); bispécifiques – PTs, CpTs, CpTsc. Les régimes alimentaires étaient basés sur un apport de 140 cellules.μL^{-1} volume équivalent *P. lutheri* et le rapport de taille cellulaire considéré entre les algues

était de 1 Tc – 1 Ts – 7 P – 14 Cp. Les diètes bispécifiques (50/50) reposaient également sur ces équivalences de volume cellulaire. À l'issue de chaque expérience d'une durée de une (exp 1) à deux semaines (exp 2), la mortalité cumulée était déterminée par comptage au microscope des larves translucides sur un échantillon de 500 individus par bécher, tandis que la croissance était appréciée par détermination de la longueur en analyse d'images à l'aide du logiciel SXM. Enfin, le taux journalier de croissance était déterminé par la différence entre la longueur finale et initiale divisée par la durée de l'expérience. L'influence de la nutrition sur la croissance larvaire était déterminée par analyse de variance de la longueur couplée à des tests de comparaisons multiples de moyennes de Sheffé.

RÉSULTATS

Au cours de la première expérience (Figure 1) et à l'issue d'une semaine d'élevage (correspondant au 21e jour après fécondation sur l'ensemble du cycle d'élevage) les mortalités larvaires relevées durant cette période étaient faibles (< 10%), quel que soit le régime nutritionnel, mais les longueurs finales obtenues ont conduit à des croissances globalement médiocres. En fin d'expérience, une analyse de variances démontrait néanmoins l'influence significative du facteur nutritionnel sur la longueur larvaire ($F = 6,35$; $dl = 4$; $P < 0,001$). La meilleure performance était ainsi enregistrée avec *T. striata* avec un taux de croissance larvaire de 4,91 µm.j^{-1} (*vs* 1,03 et 1,92 µm.j^{-1} respectivement pour *P. lutheri* et *T. chui*; Tableau 1).

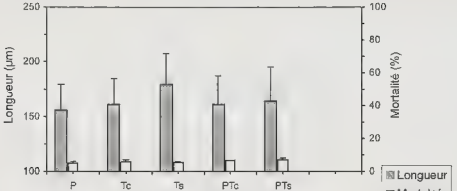


Figure 1. Expérience 1 Longueur finale et mortalité moyenne (± écart type) de larves umbonées de *Crassostrea gigas* alimentées pendant une semaine avec *Tetraselmis chui* (Tc) et *T. striata* (Ts). P = *Pavlova lutheri*, Tc = *Tetraselmis chui*, Ts = *Tetraselmis striata*

Au vu de ces résultats la deuxième expérimentation n'a concerné que la seule *T. striata* où les résultats précédents n'ont pu être confirmés. En effet, à l'issue de deux semaines d'élevage (correspondant au 24e jour après fécondation sur l'ensemble du cycle d'élevage) aucune des larves alimentées avec cette seule microalgue fraîche n'a survécu (Ts), cette mortalité atteignant 60% avec l'algue conservée (Tsc) (*vs* un maximum de 8,5% pour les autres régimes monospécifiques). De plus, toujours sur régime monospécifique, les croissances larvaires restaient bien inférieures à celles enregistrées chez les témoins (1,51 µm.j^{-1} pour Tsc *vs* 4,58 et 7,19 µm.j^{-1} respectivement

pour *P. lutheri* et *C. calcitrans* forma *pumilum*; Figure 2 et Tableau 1). Associée en tant qu'algue fraîche avec *P. lutheri* une moindre croissance était enregistrée par rapport à celle obtenue avec la seule Haptophycée (1,83 µm.j^{-1} *vs* 4,58 µm.j^{-1}). Par ailleurs, aucune différence significative de taille finale ($P < 0,05$) et donc de taux de croissance n'était observée lorsque *T. striata* était combinée avec *C calcitrans* forma *pumilum* en tant qu'algue fraîche (6,26 µm j^{-1} *vs* 7,19 µm.j ^{1}, respectivement pour CpTs et Cp) ou sous sa forme conservée (7,49 µm.j^{-1} *vs* 7,19 µm.j ^{1}, respectivement pour CpTsc et Cp; Figure 2 et Tableau 1).

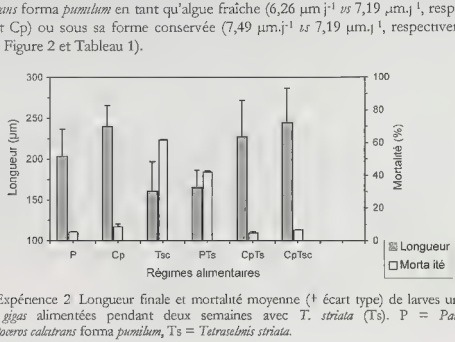


Figure 2. Expérience 2: Longueur finale et mortalité moyenne (+ écart type) de larves umbonées de *Crassostrea gigas* alimentées pendant deux semaines avec *T. striata* (Ts). P = *Pavlova lutheri*, Cp = *Chaetoceros calcitrans* forma *pumilum*, Ts = *Tetraselmis striata*.

Tableau 1: Longueur finale moyenne et taux de croissance moyen (± erreur standard) de larves umbonées de *Crassostrea gigas* soumises à différents assemblages nutritionnels constitués de microalgues fraîches (Expérience 1) et/ou conservées (Expérience 2).
Expérience 1: Taille initiale des larves 149,68 µm (± 21,10), durée de l'expérience 6 jours.
P= *Pavlova lutheri*, Tc = *Tetraselmis chui*, Ts = *Tetraselmis striata*
Expérience 2: Taille initiale des larves 139,31 µm (± 15,70), durée de l'expérience 14 jours.
P= *Pavlova lutheri*, Cp = *Chaetoceros calcitrans* forma *pumilum*, Ts = *Tetraselmis striata* fraîche, Tsc = *Tetraselmis striata* conservée.
Les longueurs finales moyennes annotées par des lettres différentes présentent des différences significatives au seuil de 5%

Expérience 1			*Expérience 2*		
Regime alimentaire	Longueur finale (µm)	Taux de croissance (µm.j^{-1})	Régime alimentaire	Longueur finale (µm)	Taux de croissance (µm.j^{-1})
P	155,91^{a}	1,03 (±1,14)	P	203,46^{b}	4,58 (±0,38)
Tc	161,23^{a}	1,92 (±1,14)	Cp	240,06^{c}	7,19 (±0,34)
Ts	179,14^{b}	4,91 (±1,27)	Ts	Pas de survie	
PTs	164,51^{ab}	2,45 (±1,16)	Tsc	160,39^{a}	1,51 (±0,27)
PTc	161,26^{a}	1,93 (±1,03)	PTs	164,88^{a}	1,83 (±0,25)
-		-	CpTs	244,27^{c}	6,26 (±0,45)
-	-	-	CpTsc	226,98^{c}	7,48 (±0,45)

DISCUSSION ET CONCLUSION

La plupart des travaux de la littérature s'accorde pour qualifier *T. suecica* comme une microalgue de faible valeur nutritionnelle lorsque celle-ci constitue la seule ration alimentaire chez les larves et juvéniles d'Ostréidés (Laing et Millican, 1986; Nell et O' Connor, 1991; O' Connor *et al.*, 1992; Robert *et al.*, 2000; Robert *et al.*, 2001). Cependant, une sensible amélioration des performances de croissance et/ou de survie des mollusques est souvent enregistrée lorsque cette Prasinophycée est associée à une ou plusieurs autres espèces phytoplanctoniques (Laing et Millican, 1986; Robert *et al.*, 2001). De tels résultats ont été rapportés avec *T. chui* chez des juvéniles de *Saccostrea commercialis* (O' Connor *et al.*, 1992). À notre connaissance, seuls les travaux de Wikfors *et al.* (1996) démontrent la bonne valeur nutritionnelle de *T. chui*, quelle que soit l'origine de la souche, pour des juvéniles de *Crassostrea virginica* alimentés sur régimes monospécifiques. Par contre, ces croissances sont nettement plus contrastées lorsque ce même naissain est alimenté avec *T. striata;* en ce cas une seule souche permettait des performances supérieures à celles enregistrées chez le témoin, représenté par des naissains alimentés avec la Prymnesiophycée *Isochrysis* aff. *galbana* souche T-Iso (Wikfors *et al.*, 1996).

Nos expérimentations sur des larves âgées de *C. gigas*, aptes à ingérer des microalgues de plus grande taille, n'ont pas permis de valider la bonne valeur alimentaire de ces Prasinophycées. En effet, au cours de la première expérimentation, les performances de développement larvaire de *C. gigas* alimentées avec *T. chui*, considérée comme la meilleure microalgue pour des juvéniles de *C. virginica* (Wikfors *et al.*, 1996), n'étaient pas statistiquement différentes de celles enregistrées chez les témoins recevant *P. luthen*. Par contre, une meilleure croissance par rapport à ces mêmes témoins étaient enregistrées au cours de la première expérience avec la seule *T. striata*. Avec cette dernière, ces bonnes performances n'ont pu être confirmées au cours de la deuxième série expérimentale. En effet, une faible survie était enregistrée, d'une part, chez les larves alimentées avec la seule *T. striata* fraîche et, d'autre part, les croissances larvaires enregistrées avec cette même microalgue conservée étaient bien inférieures à celles enregistrées chez les témoins recevant exclusivement *P. luthen*, ou *C. calcitrans* forma *pumilum*. De plus, en régimes bispécifiques l'apport de *T. striata* fraîche ou conservée n'a pas amélioré les performances larvaires. Les divergences entre nos résultats et ceux rapportés par Wikfors *et al.* (1996) pourraient s'expliquer soit par des exigences nutritionnelles propres à chaque espèce (*C. gigas vs C. virginica*) ou stade de développement (larvaire *vs* juvénile) comme rapportées par Knauer et Southgate (1999). Une modification de la qualité biochimique des microalgues utilisées, liée à des conditions de culture différente (ex: batch *vs* semi-continu, milieu de Conway *vs* E. medium), comme rapportée par certains auteurs (Wikfors *et al.*, 1984; Lourenco *et al.*, 1997), pourrait constituer une autre explication possible.

L'utilisation de *T. striata*, y compris sous sa forme conservée, a cependant permis la substitution d'une importante partie (50%) de *C. calcitrans* forma *pumilum*, caractérisée par une valeur nutritionnelle élevée pour les larves de *C. gigas* (Robert *et al.*, 1989), sans influencer négativement les performances de croissance et de survie larvaire.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Benemann J R , 1992. Microalgae aquaculture feeds. *Journal of Applied Phycology* **4** 233-245

Brown M R , Jeffrey S W , Volkman J K & Dunstan G.A , 1997. Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture* **151**: 315-331.

Coutteau P & Sorgeloos P., 1992 The use of algal substitutes and the requirement for live algae in the hatchery and nursery rearing of bivalve molluscs an international survey. *Journal of Shellfish Research* **11**(2): 467-476

Knauer J. & Southgate P C , 1999. A review of the nutritional requirements of bivalves and the development of alternative and artificial diets for bivalve aquaculture *Reviews in Fisheries Science*, **7**(3-4) 241-280.

Lorenco S O., Lanfer Marquez U.M., Mancini-Filho J., Barbarino E & Aidar E , 1997 Changes in biochemical profile of *Tetraselmis gracilis*. 1 Comparison of two culture media *Aquaculture* **148**: 153-168

Laing I & Millican P.F., 1986 Relative growth and growth efficiency of *Ostrea edulis* L spat fed various algal diets *Aquaculture* **54**. 245-262

Nell J A & O'Connor W.A , 1991 The evaluation of fresh algae and stored algal concentrates as a food source for Sydney rock oyster, *Saccostrea commercialis* (Iredale and Roughley), larvae *Aquaculture* **99**: 277 284

O'Connor W A , Nell J A., & Diemar J A , 1992 The evaluation of twelve algal species as food for juvenile Sydney rock oysters *Saccostrea commercialis* (Iredale & Roughley) *Aquaculture* **108**: 227-283.

Robert R , Noel T. & Galois R , 1989 The food value of five unicellular diatoms to the larvae of *Crassostrea gigas* Thunberg. *In*. Proceedings Aquaculture Europe '89. October 2-4 Bordeaux (France). *EAS Special Publication* **10**: 215-216.

Robert R & Trintignac P., 1997. Microalgues et nutrition larvaire en écloserie de mollusques. *Haliotis* **26** 1-13

Robert R & Gérard A , 1999 Bivalve hatchery technology. the current situation for the Pacific oyster *Crassostrea gigas* and the scallop *Pecten maximus* in France *Aquatic Living Resources* **12**(2) 121-130

Robert R , Parisi G , Pastorelli R., Poli B M & Tredici M., 2000 Nutritional value of preserved *Tetraselmis suecica* for *Crassostrea gigas* spat AQUA 2000, responsible aquaculture in the new millennium, Nice, 2 6 may 2000, special publication 28: 601.

Robert R , Parisi G , Rodolfi L , Poli B.M. & Tredici M.R , 2001 Use of fresh and preserved *Tetraselmis suecica* for feeding *Crassostrea gigas* larvae. *Aquaculture* **192**: 333-346.

Tredici M R., Chini Zittelli G & Montani E., 1996. Cold preservation of microalgae aquaculture feeds Proceedings of Refrigeration Science and Technology, Bordeaux, France, 20-22 March. pp 25-32

Walne P R , 1966 Large scale culture of larvae of *Ostrea edulis* (L) *Fisheries Investigations*, London., (2)**24**(4) 1 52.

Wikfors G H , Twarog J W & Ukeles R , 1984 Influence of chemical composition of algal sources on growth of juvenile oysters, *Crassostrea virginica*. *Biological Bulletin* **167**: 251-263.

Wikfors G H , Patterson G W , Ghosh P , Lewin R.A., Smith B.C & Alix J H , 1996 Growth of post-set oysters *Crassostrea virginica*, on high-lipid strains of algal flagellates *Tetraselmis* spp. *Aquaculture* **143**: 411 419

Drag coefficients: a comparison of ten species of freshwater gastropod molluscs

Georges DUSSART [1]

ABSTRACT

Drag coefficients of the shells of several species of aquatic gastropods were measured and found to lie between 0.195 for and 0.796. Certain species such as *Lymnaea peregra* Muller, 1774, *Lymnaea stagnalis* (Linnaeus, 1758), *Bulinus truncatus* (Audouin, 1827), *Bulinus tropicus* (Krauss, 1848) and *Biomphalaria glabrata* Say, 1818 showed smooth relationships between C_d and Reynolds number (*Re*) signifying that shells were acting as complex biological structures. For other species such as *Bulinus jousseaumei* Dautzenberg, 1890, *Melanoides tuberculata* (Muller, 1774), *Stagnicola elodes* (Say, 1821), *Thiara granifera* (Lamarck, 1822) and *Helisoma duryi* (Wetherby, 1879) relationships were more complicated, suggesting unstable hydrodynamic phenomena were involved. This information might be useful when considering the biology of such freshwater pest snails, whether as intermediate hosts of schistosomiasis (e.g. *B. glabrata*) or as problems in water treatment works (e.g. *L. peregra*).

RÉSUMÉ

Les coefficients de resistance: une comparaison entre dix espèces de gastéropodes d'eau douce.

Les coefficients de resistance (C_d) des coquilles de plusieurs espèces de gastéropodes aquatiques étaient mesurés et ils se situaient entre 0.195 et 0.796. Pour quelques espèces comme *Lymnaea peregra* Muller, 1774, *Lymnaea stagnalis* (Linnaeus, 1758), *Bulinus truncatus* (Audouin, 1827), *Bulinus tropicus* (Krauss, 1848) et *Biomphalaria glabrata* Say, 1818, il y avait un rapport lisse entre C_d et les nombres de Reynolds, ce qui montrait que les coquilles se comportent comme des structures biologiques complexes. Pour d'autres espèces comme *Bulinus jousseaumei* Dautzenberg, 1890, *Melanoides tuberculata* (Muller, 1774), *Stagnicola elodes* (Say, 1821), *Thiara granifera* (Lamarck, 1822) et *Helisoma duryi* (Wetherby, 1879), les rapports étaient plus compliqués, montrant qu'il y avait des phénomènes hydrodynamiques et non-stables. Ces résultats peuvent être utiles lorsqu'on considère la biologie de ces gasteropodes d'eau douce qui sont des animaux nuisibles, soit en tant qu'hôtes intermédiaires de la schistosomiose (e.g. *B. glabrata*), soit comme source de problèmes dans les station d'épuration des eaux (e.g. *L. peregra*).

[1] Ecology Research Group, Canterbury Christ Church University College, Canterbury, Kent CT1 1QU England
e-mail <gbd1@cant.ac.uk>

INTRODUCTION

Aquatic snails are subject to water flow in one form or another. Heavy rainfall causes streams to increase their flow rate and snails in such streams have to resist this flow to avoid being swept downstream. Dussart and Pointier (1999) observed differences in the ecological distribution of *Melanoides tuberculata* and *Thiara granifera* which were living in rivers in Martinique. Their distributions were affected by different flow regimes. Snails living in the littoral regions of lakes are affected by turbulence caused by waves. Thus shells of *Lymnaea* spp. appear to have different forms in different parts of the littoral on the Seealpsee in the Swiss alps (Wullschleger and Ward, 1998). Aquatic snails often act as intermediate hosts for parasitic disease such as schistosomiasis. Intermediate hosts such as *Bulinus truncatus* can colonise irrigation ditches and canals (Laamrani, Laghroubi, Khallaayoune, Madsen and Gryseels, 1997) thereby spreading disease. *Oncomelania* spp are likely to spread schistosomiasis as a result of irrigation systems developed in the Three Gorges Dam project on the Yangtze river in China (Xu and Dussart, 2000).

From experiments based in flumes, Jobin and Ippen (1964) gave recommended flow rates for dislodging specimens of *Biomphalaria (Australorbis) glabrata* and measured dimensionless drag coefficients of 0.4–0.8. Dussart (1987) measured variation in the hydrodynamic performance of living specimens of a range of freshwater snail species and Dussart (1992) observed that low concentrations of molluscicide could affect the ability to resist increases in flow rate. Although Jobin and Ippen (1964) measured the drag coefficients of *B. glabrata*, little is known about the hydrodynamic performance of other freshwater snail species. Such information could be useful in dealing with situations where aquatic snails cause problems, for example as vectors of parasitic disease or where they invade water treatment works or power stations. The aim of the present study was therefore to measure and compare drag coefficients in a range of freshwater snail species, including some intermediate host species for schistosomiasis.

METHODS

Experimental details and validation are described in Dussart and Pointier (1999). Specimens were killed by rapid immersion in boiling water and the soft parts were removed. A small piece of paper was fitted to, and glued over, the aperture of the shell to prevent excess turbulence which might otherwise have affected the results. The shell was glued to the end of a piston (Fig.1) with hot glue before being placed in a controlled flow of water down a pipe. In these conditions, there is laminar, shear flow in the pipe, verified experimentally by Pitot tubes and also by hydrodynamic calculations. The shell was held in the centre of the pipe, orientated as if the animal was crawling upstream (Dussart, 1987). The movement of the piston was measured for a range of shell sizes and a range of flow rates. From knowledge of the fundamental properties of water (viscosity, density etc), the rate of water flow and the force needed to move the piston, the Reynolds number and drag coefficient of the shell can be obtained.

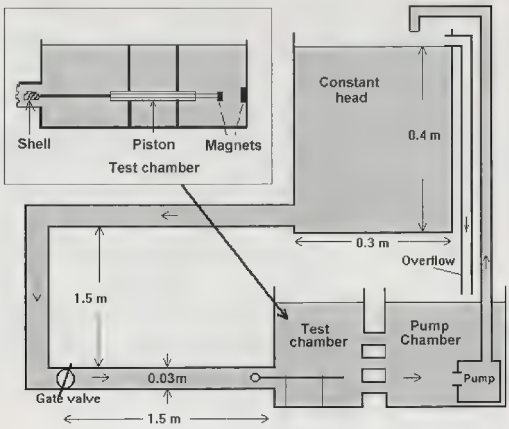


Figure 1. Design of the experimental apparatus.

Reynolds number is a dimensionless value that identifies the point when, as flow rate increases, laminar flow switches to turbulent flow. This depends on the relationships between the size of the object or system being considered and the velocity, density and viscosity of the liquid (Vogel, 1983). These parameters can be combined to give a value for the switch point. This value is called the Reynolds number (*Re*) and is defined as:-

$$Re = \frac{\rho l v}{\mu}$$

where ρ = density of liquid
l – size (length of object or diameter of pipe)
v = velocity
μ = dynamic viscosity

According to Vogel, a large whale swimming at 10 m/s will have a Reynolds Number of 30000000. For an invertebrate larva moving at 1mm/s, *Re* – 0.3. Laminar flow changes to turbulent flow when *Re* ≈ 2000.

The drag coefficient (C_d) is related to Reynolds number and is defined by Denny (1988) as:

$$C_d = \frac{2F}{\rho S v^2}$$

where S = area of object projected into the stream of liquid

F = drag force

In the apparatus used here, piston deflection was initially calibrated against known force values. When testing shells, the deflection was converted to a force and interpolated in the above equation to obtain the drag coefficient. Vogel (1983) plotted curves of drag coefficient against the log of the Reynolds Number and noted that simple physical objects such as cylinders and spheres show abrupt transitions (Fig. 2); Vogel suggested that irregular, biological objects show smoother transitions. In the work described here, graphs of C_d on *Re* were similarly plotted.

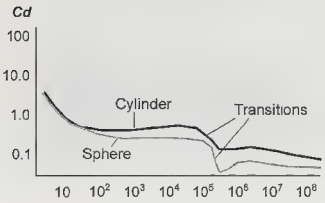


Figure 2. Relationships between drag coefficient (Cd) and Reynolds number (Re) for a sphere and a cylinder. Redrawn from Vogel (1983)

RESULTS

Drag coefficients for the snails investigated here are show in Table 1 together with means and standard deviations. The drag coefficients ranged between 0.195 for *Lymnaea stagnalis* and 0.796 for *Bulinus tropicus*. Fig. 3 shows polynomial lines-of-best fit plots of C_d on $\log_{10} Re$ for each species, together with a picture of a typical adult shell of the snail species concerned. In all cases, as expected, there is a trend to decreased drag coefficient at higher Reynolds numbers. Most of the curves are relatively smooth, though the curves for *M. tuberculata, T. granifera, S. elodes, H. duryi* and *B. jousseaumei* tend to be more complex, often showing a peak at the lower $\log_{10} Re$ values for each curve. Thus, there is a peak at 3.8 for *S. elodes,* though this could be due to a rogue observation. On several curves, there appears to be an inflexion at higher *Re* values - for example at 4.5 for *M. tuberculata* and 4.1 for *B. glabrata.*

Table 1 Drag coefficients for shells of the ten aquatic snail species studied in this investigation

	Mean length of shell	Mean C_d	Standard deviation	Variance
Melanoides tuberculata	18,3	0,39	0,12	0,02
Stagnicola elodes	15,9	0,665	0,32	0,10
Lymnaea stagnalis	28,1	0,195	0,05	0,00
Thiara granifera	16,0	0,442	0,16	0,02
Bulinus truncatus	8,6	0,662	0,36	0,13
Lymnaea peregra	13,2	0,412	0,15	0,02
Bulinus tropicus	8,0	0,796	0,24	0,06
Bulinus jousseaumei	8,9	0,698	0,31	0,09
Biomphalaria glabrata	12 3 (diameter)	0,378	0,30	0,09
Helisoma duryi	9 0 (diameter)	0,467	0,26	0,07

DISCUSSION

Denny (1988) noted that "the magnitude of the drag coefficient depends on the precise pattern in which fluid moves around the object". When *Re* lies between 10 40 there are attached vortices (Vogel, 1983), and between 40-200 000, vortices detach, forming von Karman trails. Above *Re* – 200 000, conditions are fully turbulent. All *Re* values for the snail shells tested here lay between approximately 1000 and 100000. The C_d values were relatively similar between species and reflected those reported by Jobin and Ippen (1964).

Inspection of Figure 3 suggests that there are too few points on many of the graphs to be certain of the interpretation of the curves, though some conclusions can be drawn. The polynomial curves of C_d on *Re* showed relatively smooth transitions for many species such as *L. stagnalis*, *B. truncatus* and *B. glabrata*, probably reflecting Vogel's observation about smooth transitions resulting from complex biological objects. However, *M. tuberculata* showed a curve with a characteristic peak at $\log_{10} Re$ – 4.5. This particular population (MAD) came from Martinique and other populations from this island show different curves (Dussart and Pointier, 1999). *T. granifera* showed more variation around the curve. These latter two species have pronounced shell ornamentation which may affect their hydrodynamic performance; the shells of *M. tuberculata* are strongly ribbed, whereas *T. granifera* shells are covered with tubercles. Specimens of *S. elodes* tested here tended to have striated shells and also showed a complex pattern of C_d/Re, similar to that shown by *M. tuberculata*.

The smooth curve transitions shown by *B. tropicus*, *B. truncatus* and *B. jousseaumei* suggest that although the shells have a rather globular shape, they do not behave like simple spherical objects. It is possible that the shape of the spire affects the vortices which are formed in the wake of the shells, possibly by shedding vortices as von Karman trails. This may have a survival potential when the snails are faced with periods of high velocity water flow. By shedding vortices, they may be able to stay attached for longer, thus resisting the force of the water.

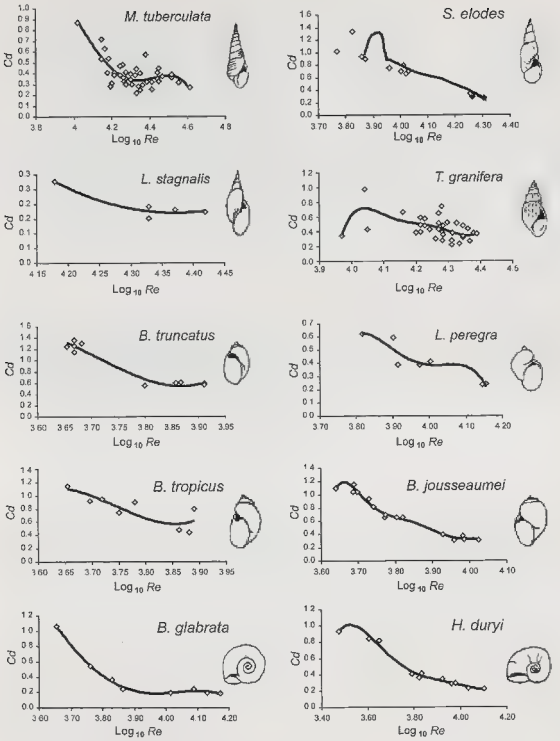


Figure 3. Relationships between drag coefficient (C_d) and Reynolds number (Re) for shells of the ten aquatic snail species studied in this investigation.

Many species of aquatic snails cause problems by spreading disease through waterways, and by obstructing the flow of water in artificial systems such as power station intakes and water treatment plants. For example, *L. peregra* has become a serious problem in some water treatment works which use plastic media in trickling filters in England. Hydrodynamic data obtained from studies of aquatic snails by researchers such as Jobin and Ippen (1963) were seminal in guiding engineers in designing channels which would restrict snail settlement and reproduction (e.g. McJunkin, 1975). However, with some exceptions (e.g. Moore, 1964), almost all observations have been made on *B. glabrata*, a species of snail which detaches easily. By contrast, snails such as *Bulinus* spp. and *L. peregra* can resist high rates of water velocity, partly as a result of their behaviour (Dussart, 1987) but also, as shown here, because their shells represent complex biological objects with a characteristic hydrodynamic performance.

CONCLUSION

The aquatic gastropod shells investigated here had drag coefficients which lay between between 0.195 for *Lymnaea stagnalis* and 0.796 for *Bulinus tropicus*. Some shells showed complex relationships between C_d and Re *(e.g. M. tuberculata)* whereas for others *(e.g. B. glabrata)*, relationships were relatively simple, indicating complex hydrodynamic properties. The research reported here suggests that for pest species such as *Biomphalaria* spp, *Bulinus* spp., *Oncomelania* spp. and *Lymnaea* spp., it would be beneficial to have more complete understanding of their hydrodynamic performance.

ACKNOWLEDGMENTS

I would like to thank J. Alabaster, C. Hodgson, N. Norman, A. Dussart and J. Montenon for their help with this work.

REFERENCES

Denny M. 1988 *Biology and the mechanics of the wave swept environment*. Princeton University Press, New Jersey.

Dussart G.B.J., 1987. Effects of water flow on the detachment of some aquatic pulmonate molluscs. *Bulletin of the American Malacological Union* (1)**5**: 565-72.

Dussart G.B.J., 1992. Effect of molluscicides on the surfacing and flow resistance of freshwater gastropods. Proceedings of the Tenth International Malacological Congress. University of Tubingen, Germany 1: 259-265.

Green P., Dussart G.B.J. & Gibson C., 1992. Surfacing and water leaving behaviour of the freshwater pulmonate snails *Lymnaea peregra* (Müller), *Biomphalaria glabrata* (Say) and *Bulinus jousseaumei* (Dautzenberg). *Journal of Molluscan Studies* **58**: 169-179.

Dussart G.B.J. & Pointer J.-P., 1999. A comparative study of the hydrodynamic performance of shells of *Thiara granifera* (Lamarck, 1822) and *Melanoides tuberculata* (Muller, 1774). *Malacological Review* Supplement **8**: 19-29.

Jobin W. & Ippen A., 1964. Ecological design of irrigation canals for snail control. *Science* **145**: 1324-1326.

Laamrani H., Laghroubi M., Khallaayoune K., Madsen H. & Gryseels B., 1997. Microdistribution of *Bulinus truncatus* in tertiary siphon boxes in Tessaout Amont irrigation system, Morocco: preliminary

results. Proceedings of 'Workshop on Medical Malacology in Africa', Harare, Zimbabwe September 22 26. 185-191. Danish Bilharzia Laboratory, Copenhagen.

McJunkin F E., 1975 *Water engineers, development and disease in the Tropics* Agency for International Development, Washington DC.

Moore I., 1964 Effects of water currents on freshwater snails *Stagnicola palustris* and *Physa propinqua*. *Ecology* **45**. 558-564.

Shapiro A., 1974. *Shape and flow: the fluid dynamics of drag*. Heinemann, London.

Wullschleger E & Ward P., 1998 Shell form and habitat choice in *Lymnaea*. *Journal of Molluscan Studies* **64** 402-404.

Vogel S., 1983 *Life in moving fluids. The physical biology of flow*. Princeton University Press, Princeton, New Jersey.

Xu X-J. & Dussart G B J., 2001 Dammed snails - Schistosomiasis vectors and the Three Gorges Dam *Biological Science Review* **14**: 34-37.

Effects of Al, Ni, Co, Zn, Cd, and Cu metals on the outer mantle epithelium of *Anodonta cygnea* (Unionidae)

*Célio ANTUNES [1], Teresa MAGALHÃES-CARDOSO [1] Gabriela MOURA [1], Domitília GONÇALVES [1] and Jorge MACHADO [1,2]**

ABSTRACT

Previous essays under short-circuit conditions, when the Ca^{2+} concentration in the bathing fluids was increased from 1 to 6 mM the conductance of the outer mantle epithelium (OME) of *Anodonta cygnea* increased 88.5% while there was a fall of 79% in short-circuit current (Isc). Proportional variations occurred also in the conductance and short-circuit current depending on the lower or higher calcium concentrations of the body fluids during the winter and summer seasons, respectively.

Under the same conditions the heavy metal ions at final concentrations of 0.1mM showed clear effects on the OME. Zinc or cadmium when added to either side or copper when added to the haemolymph side (final concentrations 0.1 mM) induced significant reductions in the OME conductance. Copper induced a significant increase in conductance from the shell side. Aluminium, nickel and cobalt did not affect the conductance from either side. These heavy metals and in particular copper, cadmium, zinc and cobalt and less nickel and aluminium seem to interfere on the shell calcification conditions. In fact, they caused from either side a significant fall in the short-circuit current which is due to a secretion of protons into the extrapallial compartment (shell side) and of bicarbonate into the haemolymph. The fall in short-circuit current induced by copper is striking when it is added to the shell side suggesting a direct action on the proton pump.

Copper and nickel also induced a significant increase in the carbonic anhydrase activity in OME homogenates. Zinc, copper and cobalt caused an increase in the cell content of ATP, ADP and AMP in tissue homogenates.

With these results, obtained under a calcium normal range (1-6 mM), may be speculated that these metals will favour the acidification of the haemolymph with subsequent mobilisation of calcium and

[1] ICBAS - Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Laboratório de Fisiologia Aplicada, Universidade do Porto, 4099-003, Portugal (* *Corresponding author*, e-mail <jmachado@icbas.up.pt>)

[2] CIIMAR - Centro Interdisciplinar de Investigação Marítima e Ambiental, Universidade do Porto, Porto 4099-003, Portugal.

alkalinization of the extrapallial compartment with consequent precipitation of calcium in the shell. The calcification inductor effect is probably more intense with the copper, cadmium and zinc addition in the shell side.

RÉSUMÉ

Effets des métaux Al, Ni, Co, Zn, Cd, et Cu sur l'épithélium extrapalléal du manteau de *Anodonta cygnea* (Unionidae)

Les essais réalisés précédemment, dans des conditions de court-circuit et des concentrations de 1 à 6 mM de Ca^{++} dans les fluides du Lan, ont montré que la conductance de l'épithelium extrapalléal du manteau chez *Anodonta cygnea* croît de 88,5% tandis que le courant de court-circuit (Isc) diminue de 79% . Des variations proportionnelles sont observées aussi dans la conductance et le courant de court-circuit en fonction des concentrations plus hautes ou plus basses de calcium dans les fluides organiques pendant les saisons d'hiver ou d'été, respectivement.

Dans ces conditions, les ions de métaux lourds à une concentration finale de 0,1 mM présentent un effet évident sur l'épithelium extrapalléal. Le zinc ou le cadmium ajoutés sur l'un ou l'autre des bords, et le cuivre ajouté sur le bord de l'hémolymphe (à une concentration finale de 0,1 mM) induisent des réductions significatives de la conductance de l'epithelium extrapalléal. Le cuivre induit une augmentation importante sur le bord de la coquille. L'aluminium, le nickel et le cobalt ne montrent aucun effet sur la conductance quelle que soit le bord d'application. Ces métaux lourds, en particulier le cuivre, le cadmium, le zinc et le cobalt et moins le nickel et l'alluminium, semblent intervenir sur les conditions de calcification de la coquille. En realité, ils provoquent sur les deux bords une diminution significative du courant de court-circuit dûe à la sécretion de protons vers le compartiment extrapalléal (bord de la coquille) et de bicarbonate vers l'hémolymphe. La chute du courant de court-circuit induite par le cuivre est évidente quand il est ajouté sur le bord de la coquille suggérant un effect direct sur la pompe des protons.

Le cuivre et le nickel induisent aussi une augmentation significative sur l'activité de l'anhydrase carbonique dans des homogénats d'épithelium extrapalléal. Le zinc, le cuivre et le cobalt provoquent une augmentation des concentrations cellulaires de ATP, ADP et AMP dans les homogénats de tissus.

A partir de ces résultats, obtenus avec des variations de calcium normales (1-6 mM), nous pouvons suggérer que ces métaux favorisent l'acidification de l'hémolymphe et la mobilisation de calcium subséquente et l'alcalinisation du compartiment extrapalléal suivie de la précipitation de calcium sur la coquille. L'effect inducteur de la calcification est probablement plus fort avec le cuivre, le cadmium et le zinc ajoutés sur le bord de la coquille.

INTRODUCTION

Heavy metal ions in solution may have a variety of toxic effects specially on transport processes. This has been shown in particular in frog skin (Ferreira, 1970; Rodhstein, 1970; Clarkson, 1971 and Curran, 1972).

Bivalve molluscs are excellent bioacumulators of a wide range of pollutants (Simkiss *et al.*, 1982; Livingstone, 1991). They are filter feeders capable of concentrating contaminants present in the water or within sediments at concentrations too low for detection by routine monitoring techniques (Walsh *et al.*, 1994). Some metals (lead, zinc, cadmium and others) at low concentrations can be chelated by shell components and thus influence its mineralisation (Romeri, 1971; Sturensson, 1976; 1978; Lorens and Bender, 1977; Carriker *et al.*, 1980). Accumulation also takes place in soft structures of bivalves (Sturensson, 1976), in particular, gills, digestive tract, kidney, gonads, muscles (Wilbur, 1972, 1976; Blanchard and Chasteen, 1976; Carriker *et al.*, 1980; Ravera, 1984; Hemelraad *et al.*, 1990; Livingstone, 1991; Miramand and

Bentley, 1992; Walsh *et al.*, 1994). Among these the outer mantle epithelium (hereafter OME) and the gills have relatively large and very active areas of exchange with the aquatic environment (Wilbur and Saleuddin, 1983).

On the other hand, it is known the electrophysiological properties of OME in freshwater bivalves supported by the results of Coimbra *et al.* (1988), Machado *et al.* (1988a), Machado *et al.* (1990), Hudson (1992) and Coimbra *et al.* (1993). Thus, the mantle from bivalves can be used to monitor the effect of heavy metals eventually present in the aquatic environment on the short circuit current and conductance of OME. Furthermore, since that the OME has high permeability to calcium, one may predict some effect of these metals on the shell biomineralization.

The purpose of this work is to study the effects of some heavy metal elements on the ion transport system of the OME of the freshwater clam *Anodonta cygnea* using electrophysiological techniques under short-circuit conditions. Previous experiments were accomplished in the OME using solutions with different calcium contents at normal range in order to understanding the correlation between the calcium concentration and the OME conductance. It is also of interest the effect of the carbonic anhydrase activity (CA) and ATP, ADP and AMP concentrations in cell homogenates of OME when incubated with heavy metals, since they are related with the ion transport mechanisms (Coimbra *et al.*, 1988; Machado *et al.*, 1988b, Hudson, 1992; Coimbra *et al.*1992).

MATERIAL AND METHODS

Adult freshwater clams of *Anodonta cygnea* were collected from the lagoon of Mira in the North of Portugal and were kept in tanks with some natural sediment and aerated water for up to two weeks before being subjected to the experimental conditions. The water was periodically changed and some microalgae mixture from their habitat was added as a nutrient source.

The voltage clamp technique (Coimbra *et al.*, 1988, Machado *et al.*, 1990) was carried out in order to monitor continuously Isc and conductance of the preparation. The OME of both mantles were carefully dissected *in situ* and pieces, 1.2 cm in diameter, from the central area were mounted in Ussing type chambers. Adequate mixing of the solutions in both half-chambers was achieved by bubbling a mixture of 95% O_2 + 5% CO_2 through them. To avoid evaporation from the chambers the gas mixture was first saturated with water vapor. The preparation was continuously short-circuited by means of a simple electronic voltage-clamp system (Coimbra *et al.*, 1988). The epithelial conductance was measured by displacing the membrane potential by 10 mV for 15s and recording the corresponding current pulse. In this preparation the I/V curve is linear at least between -100 and + 100mV. The composition of control bathing solution is: $MgCl_2$ 0.5 mM; $CaCl_2$ 1 mM; NaCl 8.5 mM; KCl 7.5 mM; $NaHCO_3$ 10 mM. An experimental solution similar to that of control was made replacing partially NaCl and KCl by $CaCl_2$ 6 mM. Haemolymph fluid collected from the animals in winter (calcium 4 mM) and in summer (calcium 5.5 mM) were also used for bathing the OME. Experimental solutions containing zinc, copper, cadmium, aluminium, cobalt and nickel were made by dissolving the sulphate salts of these metals in control solution to a final concentration of 0.1 mM. To avoid precipitation the preparation of some solutions followed specific procedures. An initial solution was firstly prepared with all ionic elements, except sodium bicarbonate, where the metal

compound was added at 1 mM concentration. Tris base or Tris-chloride were used to adjust the pH to 7.2 depending on whether the initial pH was acid (copper) or alkaline (cadmium), respectively. This solution was then diluted in (10 mM sodium bicarbonate containing) control solution so that the final concentrations of the metal was 0.1 mM. In all assays the same OME preparation was initially subjected to the control solution for 26 30 min followed by a larger period with in experimental solution.

Carbonic anhydrase activity (CA) in the OME was determined using *p*-nitrophenyl acetate as a substrate as described by Mashiter and Morgan (1975). The hydrolysis reaction was measured spectrophotometrically at 348 nm. The enzyme activity was expressed in μmol/substrate converted/mg of protein/hr The protein concentration of the homogenate was measured by the method of Lowry *et al.* (1951). Samples of 1 mg after dried with filter paper, were collected from the central area of the preparation. The samples were then incubated in control and experimental solutions under bubbling with the gas mixture for 30 minutes. Samples were dried, fragmented into two (weighed) pieces that were treated or not with Diamox (inhibitor).

The measurements of total ATP, ADP and AMP were also carried out in control and metal treated samples, by high performance liquid chromatography (HPLC), according to methods of Fredholm *et al.* (1984) particularly adapted to our biological preparations. Samples of central region of the OME preparation of 0.05 gr dry weight were collected. One group of six samples was bathed in a control solution and another group in the metal (0.1 mM) containing solutions bubbled with the gas mixture for 30 minutes. After incubation the samples were fragmented, dried with a filter paper and placed in 500 μl of perchloric acid (3M) in order to extract the purines for 10 min with cold homogenisation at 0°C. After centrifugation at 5.000 *g* during 10 min at 0°C, the supernatant was collected and the pellet was washed with 500 μl of perchloric acid (3 M) and centrifuged again. The supernatant was then neutralised at 0°C by a KOH 4M solution buffered with Tris-base 0.4M. The neutralised samples were centrifuged at 1.500 g for 3 min at 0°C. After potassium perchloride treatment they were mixed with a a vortex. Aliquots of 250 μl from the neutralised supernatant were collected and stored at -20°C for later analysis. Samples of 20 μl were analysed, at room temperature, for the measurement of adenine nucleotides ATP, ADP and AMP using reverse phase HPLC analysis. Isocratic elution (Cunha *et al.*, 1989) with 100 mM KH_2PO_4 and 1.2 (vol/vol) methanol pH=6.0 at flow rate 1.5 ml/min was performed by an Hitachi low pressure elution system with a L-4000 gradient pump. The detection was at 254 nm in a Hitachi L-4000 multiwavelength detector connected to a Hitachi chromato-integrator D-2500. Separations were performed with a reverse phase column Lichrospher RP-18 (5 μM), 125mm 4mm (i.d.) Merck, protected by a precolumn filled with the same material. The recovery of ATP, ADP and AMP (Sigma, St Louis, MO) in the same conditions as the homogenated tissues was measured by HPLC analysis being of 97.18% ±4.3% ±0(SE) (n=8) for ATP, 99.94% ±5.5(SE) (n=8) for ADP and 89.5% ±6.4 (n=6) for AMP.

Statistical analyses with student's T test for dependent samples were used in total average of 6-9 samples for short-circuit current, conductance measurements. Student's T-test with unknown variance were used in total average of 6 samples for ATP, ADP, AMP and carbonic anhydrase activity determinations. Differences were considered significant when $p<0.05$.

RESULTS

Figure 1 reports the time course of Isc expressed as fractional values when, after a control period of 30 minutes, the preparation was incubated with a mixture of haemolymph and extrapallial fluids extracted from *A. cygnea* in the winter and summer (panel A) or physiological solution with calcium 6 mM and summer fluid (panel B). The steady state values of Isc and conductance are reported in Table 1. These results show that raising external calcium or incubation with the extracellular fluids extracted from the animal, induced a fall in Isc and an increase in epithelial conductance. Table 1 show a significant decrease of short-circuit current of 55.3%, 65 8% and 79% and an increase in membrane conductance 44%, 54% and 88.5% after incubation with organic fluids in winter (Ca 4 mM), summer (5.5 Ca mM) or physiological solution (Ca 6 mM) respectively. These results were observed comparatively to those of

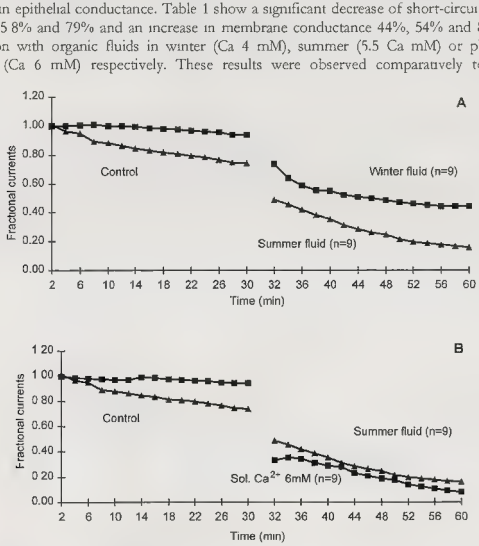


Figure 1. The outer mantle epithelium (OME) under short-circuit conditions was bathed on both sides with the mixture of haemolymph and extrapallial fluids extracted from *A. cygnea* containing calcium Ca 4 mM in the winter fluid (panel A), Ca 5.5 mM in the summer fluid (panel A and B), Ca 6 mM in physiological solution (panel B). The experimental solutions were added 30 minutes after a control period with Ca 1 mM physiological solution Plotting of fractional values (experimental/control values) of the short-circuit current (Isc), versus time, compared to the control situation with Ca 1 mM.

Table 1 Outer mantle epithelium (OME) of *A. cygnea* under short-circuit conditions, bathed on both sides with a mixture of haemolymph and extrapallial fluids presenting different calcium concentrations. 4 mM in winter, 5 5 mM in summer, 6 mM in physiological solution, and 1 mM in physiological control solution. The absolute values of short-circuit current (Isc) and conductance (Cond) are expressed in μA/cm² and mS/cm², respectively. * P < 0.05

Bath solution		Control (Ca 1mM)	Hemol-Shel
Winter fluid (Ca 4mM) (n=9)	Isc	28 11±11.81	12 56±6 81*
	Cond	1.34±0 34	1 93±0 30*
Summer fluid (Ca 5 5mM) (n=9)	Isc	23.72±20 47	8 11±9 67*
	Cond	1.21±0 43	1 86±0 27*
Physiol. Sol. (Ca 6mM) (n=9)	Isc	11.03±9 66	2.33±4 81*
	Cond	1.13±0.14	2.13±0 20*

control solution with Ca^{2+} 1mM. The larger effects obtained with summer fluids and with calcium loaded control solution were probably due to their larger calcium concentration (5.5 and 6 mM).

Figure 2 shows the time course of the effects of aluminium (panel A), nickel (panel B) and cobalt (panel C) on Isc, after a control period of 26 minutes. There was a slow but significant inhibition of Isc in all cases. The effects were somewhat larger when the aluminium and nickel metals acted from the shell side and cobalt from the haemolymph side The steady state values of Isc and conductance are reported in Table 2. Cobalt induced higher inhibition of 59.8% in Isc, when added from the haemolymph side, followed by nickel of 47 8% and aluminium of 24.8% both from the shell side. The membrane conductance in all conditions didn't change significantly.

Table 2 Outer mantle epithelium (OME) of *A. cygnea* under short-circuit conditions, incubated from haemolymph or shell side by an experimental solution with different heavy metals after bathing period with Ca^{++} 1 mM control solution The heavy metal elements were used at 0.1 mM, namely aluminium (Al), or nickel (Ni), or cobalt (Co), or zinc (Zn), or cadmium (Cd) or copper (Cu) The absolute values of short-circuit current (Isc) and conductance (Cond) are expressed in μA/cm² and mS/cm², respectively. * P < 0.05.

Incubation		Control	Hemol	Control	Shell
Al (n=7)	Isc	47 86±25 34	39 97±25 97*	62.00±12 45	46 64±13 54*
	Cond	1 54±0 44	1.56±0 37	1.87±0 55	1 88±0 53
Ni (n=6)	Isc	37.83±9.99	28.67±7.37*	39 92±14.36	20 83±6 31*
	Cond	0 80±0.19	0.78±0.25	0 84±0 25	0 77±0.19
Co (n=6)	Isc	57.17±9.68	23.00±11.84*	73.67±35 88	41.17±18.06*
	Cond	0 82±0 17	0 86±0 21	1 56±0 42	1 53±0 46
Zn (n=8)	Isc	70.94±24 86	26.44±18 45*	58 06±21 88	14 38±10 73*
	Cond	1.83±0 33	1.36±0.32*	1 48±0 36	1 08±0.26*
Cd (n=8)	Isc	68 69±29.20	15 00±10 93*	80.31±17 63	20.06±10 57*
	Cond	1 73±0 54	1 03±0 55*	1 68±0 60	1.21±0 52*
Cu (n=9)	Isc	54 56±8.42	31 50±7 57*	56 50±13 64	0 00±10 39*
	Cond	1 88±0.26	1.64±0.32*	2 10±0 73	2 53±0 72*

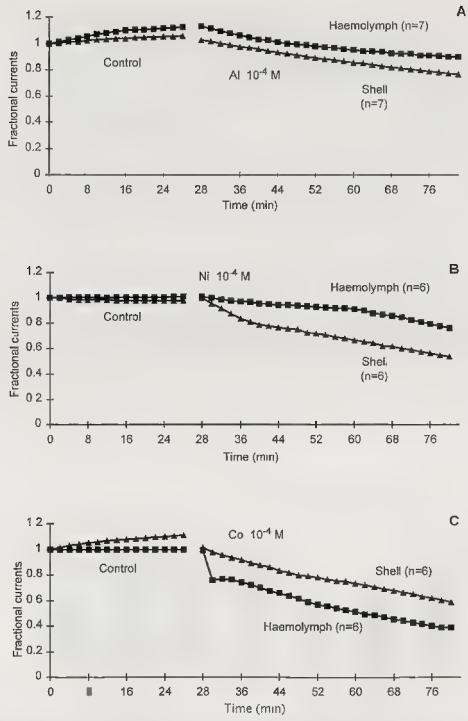


Figure 2 The outer mantle epithelium (OME) of *A. cygnea* under short circuit conditions was bathed on haemolymph or shell side by an experimental solution with different heavy metal after a period with Ca 1mM control solution The heavy metal elements were used at 0 1mM, namely aluminium (Al), or nickel (Ni) or cobalt (Co) represented in the A, B and C panels respectively Plotting of fractional values (experimental/control values) of the short-circuit current (Isc), versus time, compared to the control situation with Ca 1 mM.

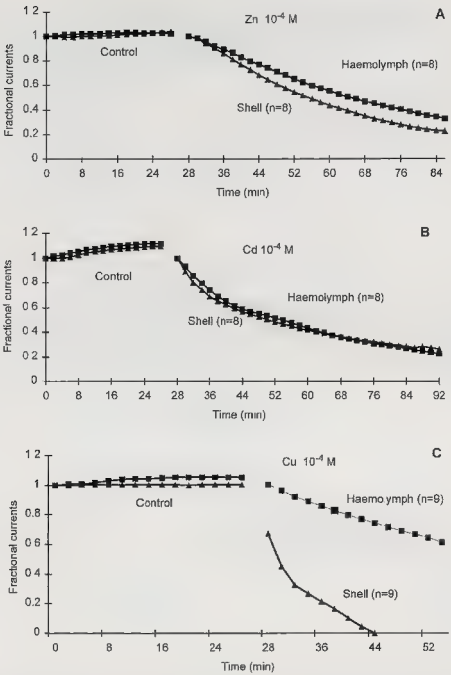


Figure 3 The outer mantle epithelium (OME) of *A. ogrea* under short-circuit conditions was bathed on haemolymph or shell side by an experimental solution with different heavy metal after a period with Ca 1mM control solution The heavy metal elements were used at 0 1mM, namely zinc (Zn), or cadmium (Cd) or copper (Cu) represented in the A, B and C panels respectively Plotting of fractional values (experimental/control values) of the short-circuit current (Isc), versus time, compared to the control situation with Ca 1mM

Figure 3 shows the time course of the effects of zinc (A), cadmium (B) and copper (C) on Isc, after a control period of 26 minutes. These metal group caused a stronger effect with a significant inhibition of Isc in all cases. They induced a fall in Isc from either of the preparation. In the case of copper there was a large and fast inhibition when the meta. was added to the shell side. Zinc and cadmium induced a significant fall in the membrane conductance from either side while copper caused a clear rise from the shell side. The steady state values of Isc and conductance are also reported in Table 2. Copper incubation in the shell side caused a strong and sharp reduction of 100% in short circuit current and also a clear increase on the conductance until 20.5% of the initial values. It was also observed a clear decrease of the short-circuit current of 42.3% and a slight reduction of conductance of 13.2% when the copper ion was added in the haemolymph side. The zinc incubation in the haemolymph and extrapallial sides decreased short-circuit current of 62.7% and 75.2%, respectively. The cadmium produces a similar profile in Isc causing falls of 78.2% from the haemolymph side and of 75% from extrapallial side. The change of conductance values due to zinc and cadmium incubations showed significant falls of 27% and 28% from shell side and of 25.7% and 40.5% from haemolymph side, respectively.

Table 3 The absolute values of carbonic anhydrase activity (mM) and AMP+ADP+ATP contents (nmoles/mg) measured in outer mantle epithelium (OME) of *A. cygnea* under control and experimental conditions The small pieces of OME were incubated during 30 minutes in experimental solution with heavy metal at 0.1 mM, namely aluminium (Al), or nickel (Ni), or cobalt (Co), or zinc (Zn), or cadmium (Cd), or copper (Cu). * $P < 0.05$

Incubation	Control	Cd	Zn	Cu	Al	Ni	Co
Anhydrase (n=10)	0 194±0 030	0 251+0 151	0 204+0 039	0 235+0 047*	0 196+0 026	0 229+0 035*	0 203+0 052
Total energy (n=6)	0 91+0.12	1.11+0.13	1.24+0.13*	1 27+0 14*	0.84+0 09	0 97+0 15	1 20+0 25*

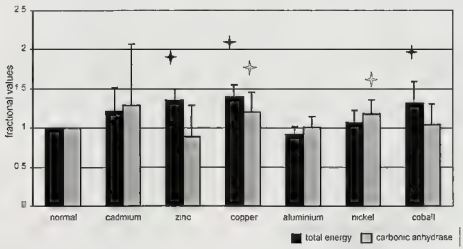


Figure 4 The fractional values of carbonic anhydrase activity (greys) and AMP+ ADP+ ATP contents (black bars) obtained from experimental conditions comparatively to the control situation The small pieces of OME from *A. cygnea* were incubated during 30 minutes in experimental solution with heavy metal ions at 0.1mM, namely cadmium (Cd), or zinc (Zn), or copper (Cu), or aluminium (Al), or nickel (Ni) or cobalt (Co). * $P < 0.05$

Figure 4 shows fractional values of the carbonic anhydrase activity and the total content of ATP + ADP + AMP measured in cell homogenates in the absence and in the presence of aluminium, nickel cobalt, copper, zinc or cadmium. The activity of carbonic anhydrase was significantly increased only by nickel of 18% and copper of 21%, while the increase in the cell content of ATP+ADP+AMP was significantly increased by zinc of 36%, copper of 40% and cobalt of 32%, compared to control values.

DISCUSSION

Heavy metals in solution such as cadmium, copper, cobalt, manganese, nickel, zinc and silver induce changes in the transport of ions across the frog skin. (Ferreira, 1970; 1978; Curran, 1972; Nagel *et al.*, 1988; Ferreira *et al.*, 1979). Copper induces an increase of short circuit current due to an increase in the apical sodium permeability of the frog skin (Ferreira, 1970; 1978 and Ferreira *et al.*, 1978) probably as a result of an effect on SH groups. Curran (1972) observed an inhibition of short-circuit current due to the significant decline of the active sodium transport when the silver ion was added to external bathing solution of frog skin. Silver also induced a rise in the permeability of the shunt pathway in the skin to sodium, potassium and chloride. According to Nagel *et al.* (1988) cadmium, cobalt, manganese, nickel and zinc applied to external surface of amphibian skin, exerts two independent effects: an increase of short-circuit current due the stimulation of sodium transport and a decrease of overall conductance in preparations with high chloride-related conductance.

These results may partially agree with those of present experiments performed in the OME of *A.cygnea* where an ion transport model was suggested by Coimbra *et al.* (1988) and Machado *et al.* (1990) and further confirmed by Hudson (1992) for *Unio complanatus*. According to this model the short-circuit current across the OME is due to a proton pump in the apical barrier, intracellular pH being maintained by a bicarbonate/chloride exchange across the basolateral barrier. The whole process depends on a supply of bicarbonate and protons via the catalysed hydration, by carbonic anhydrase, of CO_2 and on the supply of ATP (Coimbra *et al.*, 1988; Machado *et al.*, 1988a). So, if some alteration of the current eventually occurred in the OME of *A. cygnea*, under short circuit conditions, it may depend on the direct inhibition or stimulation of ion transport mechanisms across either or both barriers or to an interference with intracellular metabolism. The membrane conductance reflects the overall permeability of the epithelium to the different ions present. The major component of the conductance of the OME is the calcium conductance. The permeability to this ion is 10 times larger than to sodium, potassium or chloride (Coimbra *et al.*1988, Coimbra *et al.*1992).

In the present study the short-circuit current and conductance were used to monitor the effects caused by the heavy metal ions on the OME of *A. cygnea*. Since in this preparation the calcium conductance is the largest component of the total conductance, changes in this parameter are likely to reflect changes in calcium permeability. Changes in Isc must be due to effects in the transport of protons and linked ionic fluxes.

In the first group of previous experiments, changes from 1mM to 6 mM in the calcium concentration of the bathing fluids induced significant changes in the total conductance and on Isc, which agreed with the results already reported (Coimbra *et al.*1988; Machado *et al.*, 1990; and

Coimbra *et al.*, 1992). Similar results were obtained with body fluids collected from animals in the summer period, when the calcium concentration is closer to the 6 mM, than in the winter around (4 mM). These electrophysiological effects are possibly due to the calcium concentration rather than to hormonal or other metabolic factors in the fluids. Perhaps, the reduction of Isc in the presence of high calcium concentration is caused by dissipation of intracellular potential due to high permeability of OME to calcium ion.

Our results showed still strong effects on the short circuit current mainly by zinc, cadmium, cobalt and a lesser effects by the aluminium and nickel pollutants. These effects, consisted of a slow fall of the current which suggest an indirect mechanism, probably mediated by the intracellular electrical potential and ion concentrations. The conductance values were not very significantly altered during the same time by aluminium, nickel and cobalt, but a significant decrease by zinc and cadmium was observed. Since the membrane conductance of the controls did not increase significantly, even exhibiting a decrease, the changes in Isc described above cannot be attributed to changes in calcium permeability. This suggestion seems more evident because the calcium concentration didn't change during the heavy metal experiments as it was in the first group of assays.

Copper induced a sharp fall in Isc and a gradual increase in the preparation conductance when added to the shell side. The effect on Isc is similar to that observed with the proton pump inhibitors such as TBTO (bis(tributyltin) oxide) reported by Machado *et al* (1989). The increase in conductance is most likely due to an effect on calcium permeability for reasons presented above. We cannot also exclude any effect on the paracellular pathway as Ferreira (1970) previously reported in frog skin.

Incubation with aluminum, cadmium, nickel, zinc and cobalt had no effect or induced an increase in carbonic anhydrase activity and in the concentrations of AMP+ADP+ATP which don't agree with the significant reduction of Isc, above discussed. This contradiction is more evident with copper metal incubation because the anhydrase activity and energetic metabolites contents were clearly increased while the Isc was strongly inhibited. This is really unexpected, since the incubation of the OME of *A. cygnea* with energetic substrates induces an increase in Isc according Machado *et al.* (1988a). Thus, the observed effects do not seem to be due to an interference with the energy supply to the transporting system. These results suggest more a direct action on the ion exchangers of OME by the heavy metal incubation. Consequently, any increase of anhydrase activity and energetic metabolites contents, mainly for copper, may be considered as secondary interference resulting from the direct inhibition of transporting system.

Assuming that *in vivo* the metals studied have effects similar to those observed *in vitro* one should anticipated that a reduction in Isc reflects directly a decrease in the rate of proton pumping into the extrapallial fluid causing a rise in pH (Coimbra *et al.*, 1988; Machado *et al.*, 1990) and subsequently a shell thickening (Machado *et al.*, 1989) . Simultaneously, there should be a decrease in the pH of the haemolymph (Coimbra et *al.*, 1988; Machado *et al.*, 1990), which will cause a calcium mobilization from the calcareous spherules (Machado *et al.*1988b). These results clearly agree the experiments in *A. cygnea* carried out by Moura *et al.* (2000; 2001) where some heavy metal incubation showed a calcified organic pellicle in the shell and a calcium content increase in the body fluids mainly, under Cu and Cd conditions due to the acidosis inductor effect in the haemolymph.

CONCLUSION

The overall effect from heavy metal incubation should be an increase in free calcium in the haemolymph due to dissolution of calcareous concretions by acidification process, a diffusion of this cation by a electrochemical favourable gradient to the shell side. On the contrary, a calcium deposition in the shell may occur caused by an increase of calcium contents and an alkalinization process in the shell compartment. Thus, the results predict that an inductor effect on the shell calcification should be happen when the animals are incubated with those mentioned heavy metals which will primarily interfere on the ion transport system of OME.

AKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to express their thanks to Prof H Gil Ferreira, Eng P. Fernandes and U Santos for invaluable critical comments about electrophysiological results and help in the electronic voltage clamp system and technical collaboration, respectively The JNICT (Junta Nacional de Investigação Científica e tecnológica) and FCT (Fundação Para Ciência e Tecnologia) which supported this work is also gratefully acknowledged.

LITERATURE CITED

Blanchard S C & Chasteen N.D., 1976 Electron paramagnetic resonance spectrum of a sea shell *Mytilus edulis*. *Journal of Physical Chemistry* **80**(12): 1362-1367.

Carriker M R, Palmer R.E., Sick L.V & Johnson C.C, 1980. Interaction of mineral elements in sea water and shell of oyster (*Crassostrea virginca* (Gmelin)) cultured in controlled and natural systems *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **46**: 279-296.

Clarkson T W, Armstrong W McD. & Nunn A S., 1971. Intestinal transport of electrolytes, amino acids and sugars. (Thomas C.C. ed.), Springfield Ill.: 110.

Combra J, Machado J, Fernandes P.L., Ferreira H.G. & Ferreira K.G., 1988. Electrophysiology of the mantle of *Anodonta cygnea*. *Journal of Experimental Biology* **140**: 65-88.

Combra A M, Fernandes P.L., Ferreira K.G & Ferreira H G, 1992. Intracellular calcium in the cells of the outer mantle epithelium of *Anodonta cygnea* *Journal of Comparative Physiology A* **103** 497-500

Combra A M, Ferreira K.G, Fernandes P. & Ferreira H G., 1993 Calcium exchanges in *Anodonta cygnea* barriers and driving gradients. *Journal of Comparative Physiology* B **163**: 196-202.

Cunha R, Sebastião A N & Ribeiro J.A, 1989 Separation of adenosine triphosphate and its degradation products in innervated muscle of the frog by reverse phase high performance liquid chromatography *Chromatography* **28**. 610-612.

Curran P F, 1972 Effect of silver ion on permeability properties of frog skin. *Biochimica et Biophysica Acta* **288** 90-97

Ferreira K T G, 1970. The effect of Cu^{2+} on isolated frog skin. *Biochimica et Biophysica Acta* **203** 555-567

Ferreira K T G, 1978. The effect of copper on frog skin The role of sulphydryl groups *Biochimica et Biophysica Acta* **510**: 298-304

Ferreira K.T.G , Guerreiro M.M & Svensson W.M., 1979. The mechanism of action of Cu^{2+} on the frog skin. *Biochimica et Biophysica Acta* **552**: 341-345.

Fredholm B B , Dunwiddie T.V , Bergman B. & Lindstrom K., 1984 Levels of adenosine and adenine nucleotides in slices of rat hippocampus. *Brain Research* **295**: 127-136.

Hemelraad J., Holwerda D.A , Wijnne J.A & Zandee D.I., 1990 Effects of cadmium in freshwater clams. I. Interaction with essential elements in *Anodonta cygnea*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **19**: 686-690.

Hudson R.L , 1992 Ion transport by the isolated mantle epithelium of the freshwater clam, *Unio complanatus*. *American Journal of Physiology* **263**: R76-R83

Livingstone D.R , 1991 Towards a specific index of impact by organic pollution for marine invertebrates - Mini-Review. *Comparative Biochemistry and Physiology C* **100**: 151-155

Lorens R.B & Bender M.L , 1977 Physiological exclusion of magnesium from *Mytilus edulis* calcite *Nature* **269**: 793-794

Lowry O.H , Rosebrough N.J, Farr A.L & Randall R.J , 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent *Journal of Biology and Chemistry* **193**: 265-275.

Machado J , Ferreira K.G , Ferreira H.G & Coimbra J , 1988a Substrate activation of the short circuit current of outer mantle epithelium of *Anodonta cygnea*. *Comparative Biochemistry and Physiology A* **91**: 487-492.

Machado J , Coimbra J., Sá C. & Cardoso I , 1988b. Shell thickening in *Anodonta cygnea* by induced acidosis *Comparative Biochemistry and Physiology A* **91**: 645-651

Machado J., Coimbra J. & Sá C , 1989 Shell thickening in *Anodonta cygnea* by TBTO treatments *Comparative Biochemistry and Physiology C* **92**: 77-80.

Machado J , Ferreira K.G , Ferreira H.G & Fernandes P.L , 1990 The acid-base balance of the outer mantle epithelium of *Anodonta cygnea* *Journal of Experimental Biology* **150**:159-169.

Mashiter K.E & Morgan M.R J , 1975 Carbonic anhydrase levels in tissues of flounder adapted to seawater and freshwater. *Comparative Biochemistry and Physiology A* **52**: 713-717.

Miramand P & Bentley D., 1992 Concentration and distribution of heavy metal in tissues of two cephalopods, *Eledone cirrhosa* and *Sepia officinalis*, from the French coast of the English Channel. *Marine Biology* **114**. 407-414.

Moura G., Vilarinho L., Guedes R. & Machado J., 2000 The action of some heavy metals on the calcification process of *Anodonta cygnea* (Unionidae): nacre morphology and composition changes. *Haliotis* **29**: 43-53.

Moura G., Almeida M.J , Machado M.J C. & Machado J , 2001 Effects of heavy metal exposure on the ionic composition of fluids and nacre of *Anodonta cygnea* (Unionidae). *Haliotis* **30**: 33-44.

Nagel W , Natochin Y & Crabbé J , 1988. Effects of divalent cations on chloride movement across amphibian skin. *Pflugers Archiv: European Journal of Physiology* **411**: 540-545.

Ravera O , 1984 Cadmium in freshwater ecosystems. *Experentia* **40**.2-14

Romeril M.G., 1971 The uptake and distribution of ^{65}Zn in oysters. *Marine Biology* **9**.141-154

Rothstein A., 1970. Current topics in membranes and transport, Vol I. (F. Bronner & A Kleinzeller eds) 135 Academic Press, New York..

Simkiss K., Taylor M. & Mason A.Z., 1982. Metal detoxification and bioaccumulation in molluscs. *Marine Biology Letter* **3**: 187-201.

Sturensson U., 1976. Lead enrichment in shells of *Mytilus edulis*. *Ambio* **5**: 253-256.

Sturensson U., 1978. Cadmium enrichment in shells of *Mytilus edulis*. *Ambio* **7**: 122-125.

Walsh K., Dunstan R.H., Murdoch R.N., Conroy B.A., Roberts T.K. & Lake P., 1994. Bioaccumulation of pollutants and changes in population parameters in the gastropod mollusc *Austrocochlea constricta*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **26**: 367-373.

Wilbur K.M., 1972. Shell formation in molluscs. *In:* Chemical Zoology, Mollusca Vol. 7 (M. Florkin & B.T. Scheer, eds): 103-145. Academic Press, New York.

Wilbur K.M., 1976. Recent studies of invertebrate mineralisation. *In:* The mechanisms of mineralisation in the invertebrates and plants (N. Watabe & K.M. Wilbur, eds): 79-108. University South Carolina Press, Columbia.

Wilbur K.M. & Saleuddin S.M., 1983. Shell formation. *In*: The Mollusca Vol. IV. Physiology part 1 (K.M. Wilbur and S.M. Saleudin eds.): 235-287. Academic Press, New York.

BIBL. DU MUSEUM PARIS

Normes diverses

Les noms de taxa devront être cités et utilisés conformément au Code International de Nomenclature Zoologique (édition de 2000). Les noms génériques ou spécifiques seront écrits en *italique*, les noms de familles ou de divisions d'un rang plus élevé, en caractères normaux. Un nom spécifique, générique ou familial apparaissant pour le première fois dans le texte devra être accompagné de son auteur et date de publication. Auteur et date d'un taxon seront toutefois omis dans le titre de l'article. On évitera les tournures de phrases donnant lieu à confusion entre une référence bibliographique et l'auteur et date d'un taxon.

La bibliographie comprendra toutes les références citées dans le texte, et uniquement celles-ci. Toutefois, les références citées uniquement en tant qu'auteur et date d'un taxon ne sont pas obligatoirement incluses dans la bibliographie. Les titres des périodiques doivent apparaître *in extenso*. Les références seront citées selon un des modèles suivants:

Bourguignat J.R., 1857. Aménités malacologiques. *Revue et Magasin de Zoologie* (2)9: 3-31, pl. 1-4.

Swofford D.L. & Olsen G.J., 1990. Phylogeny reconstruction. *In:* Molecular systematics. (D.M. Hillis & C. Morris, eds.): 411-501. Sinauer Associates, Sunderland, Massachussets.

Dans le texte, on citera les références sous la forme "... selon Hall (1986)... ", "(Hall et Smith, 1986)", (Richardson *et al.*, 1985)...". Pour plusieurs articles d'un même auteur et d'une même date, on utilisera la forme "1985a, 1985b..."

Les tirés-à-part devront être commandés au moment des épreuves. Pour chaque article, 25 tirés-à-part gratuits seront envoyés aux auteurs. Des tirés-à-part supplémentaires, payants, pourront être commandés au même moment.

Comité de rédaction

Patrick ARNAUD	Station Marine d'Endoume, Rue de la Batterie des Lions, 13007 Marseille
Alan BEBBINGTON	3 Crawley Lane, Uley, Nr Dursley, Glos GL11 5 BJ, Grande-Bretagne
Alain BODOY	IFREMER, Rue de l'Ile d'Yeu,B.P. 1049 - 44037 Nantes cedex 01
Pio FIORONI	Universität Münster, Institut für Spezielle Zoologie und Vergleichende Embryologie, Hüfferstraße 1, D-48149 Münster, Allemagne
Serge GOFAS	Departamento de Biología Animal, Facultad de Ciencias Universidad de Málaga, E-29071 Málaga, Espagne
Marcel LE PENNEC	Laboratoire de Zoologie, Faculté des Sciences , 6 avenue Le Gorgeu, 29283 Brest cedex
Pierre LUBET	Laboratoire de Zoologie, I.B.B.A., Faculté des Sciences, 14032 Caen cedex
Mathieu POULICEK	Laboratoire d'Ecologie marine, Institut de Zoologie, Université de Liège, 22 Quai van Beneden, B - 4020 Liège, BELGIQUE
Jean TARDY	51, rue Emile Racaud, 17000 La Rochelle
Nardo VICENTE	C.E.R.A.M., Faculté des Sciences et Techniques, de Saint Jérôme, 13397 Marseille cedex 13

Directeur de la publication: Nardo VICENTE, Président de la S.F.M.
Coordonnateur de ce volume: Serge GOFAS

Société Française de Malacologie - siège : 55, rue Buffon, F-75005 Paris ISSN: 0397.765 X
Imprimé en Espagne par Imagraf, Málaga - Achevé d'imprimer le 5 decembre 2002

Sommaire

Articles issus du XI[ème] congrès "Malacologie 2000" de la Société Française de Malacologie (Caen, 2001)

C. BABIN
Les mollusques bivalves primitifs: l'enquête paléontologique 3

O. MOINE, D.-D. ROUSSEAU, D. JOLLY & M. VIANEY-LIAUD
Nouvelle fonction de transfert basée sur les mollusques terrestres et utilisant la méthodedu Rang Climatique Mutuel 13

B. ROMESTAND & J. TORREILLES
Étude de la résistance de l'huître *Crassostrea gigas* face à la protozoose à *Perkinsus marinus* 21

C. FABIOUX, A. HUVET, S. LAPÈGUE, S. HEURTEBISE & P. BOUDRY
Past and present geographical distribution of populations of Portuguese (*Crassostrea angulata*) and Pacific (*C. gigas*) oysters along the European and north African Atlantic coasts 33

A. SERPENTINI, J.-M. PONCET, E. BOUCAUD-CAMOU & J.-M. LEBEL
Étude de la synthèse globale de collagène produit par les hémocytes d'un mollusque nacrier, l'ormeau *Haliotis tuberculata*. Mise en évidence d'une variation annuelle 45

R. ROBERT, G. PARISI, R. PASTORELLI, B.M. POLI & M. TREDICI
The food quality of *Tetraselmis suecica* slurry for *Crassostrea gigas* spat 53

E. PONIS, G. PARISI & R. ROBERT
Valeur alimentaire de *Tetraselmis striata* et *T. chui* pour les larves de *Crassostrea gigas* 57

G. DUSSART
Drag coefficients: a comparison of ten species of freshwater gastropod molluscs 63

Article remis régulièrement

C. ANTUNES, T. MAGALHÃES-CARDOSO, G. MOURA, D. GONÇALVES & J. MACHADO
Effects of Al, Ni, Co, Zn, Cd, and Cu metals on the outer mantle epithelium of *Anodonta cygnea* (Unionidae) 71